産学官共同研究の効果的な推進　　事後評価

「抗体選択の自動化システムの開発」

代表機関名：慶應義塾大学理工学部

研究代表者名：柳川　弘志

研究期間：平成１６年度～平成１８年度

目次

Ⅰ．研究計画
１．研究の趣旨
２．研究計画
３．共同研究の目標
４．研究全体像
５．研究体制
Ⅱ．経費
１．所要経費
２．使用区分
Ⅲ．研究成果
１．研究成果の概要
（１）研究目標と目標に対する結果
（２）共同研究の目標に対する達成度
（３）当初計画どおりに進捗しなかった理由
（４）科学的・技術的価値について
（５）科学的・技術的波及効果について
（６）社会的・経済的波及効果について
（７）民間企業との役割分担及び産学官での共同研究によって得られた効果について
（８）研究成果の発表状況
２．研究成果：サブテーマ毎の詳細
（１）サブテーマ１
（２）サブテーマ２
（３）サブテーマ３
Ⅳ．実施期間終了後における取組みの継続性・発展性
Ⅴ．自己評価
１．目標達成度
２．研究成果
３．研究計画・実施体制

Ⅰ．研究計画

■プログラム名：　産学官連携共同研究の推進　（事後評価）
■課題名：抗体選択の自動化システムの開発
■代表研究機関名：慶應義塾大学理工学部
■研究代表者名（役職）：柳川弘志（教授）
■　共同研究機関名：株式会社池田理化
　　ゾイジーン株式会社
■　共同研究機関代表者名（役職）：木崎民生（株式会社池田理化代表取締役社長）
　　三津家正之（ゾイジーン株式会社取締役社長）
■研究実施期間：　３年間
■研究総経費
　調整費受給機関での研究総経費（調整費充当分）：　総額　160.6 百万円　（間接経費込み）
　共同研究機関での研究総経費：　総額　78.4 百万円

１．研究の趣旨

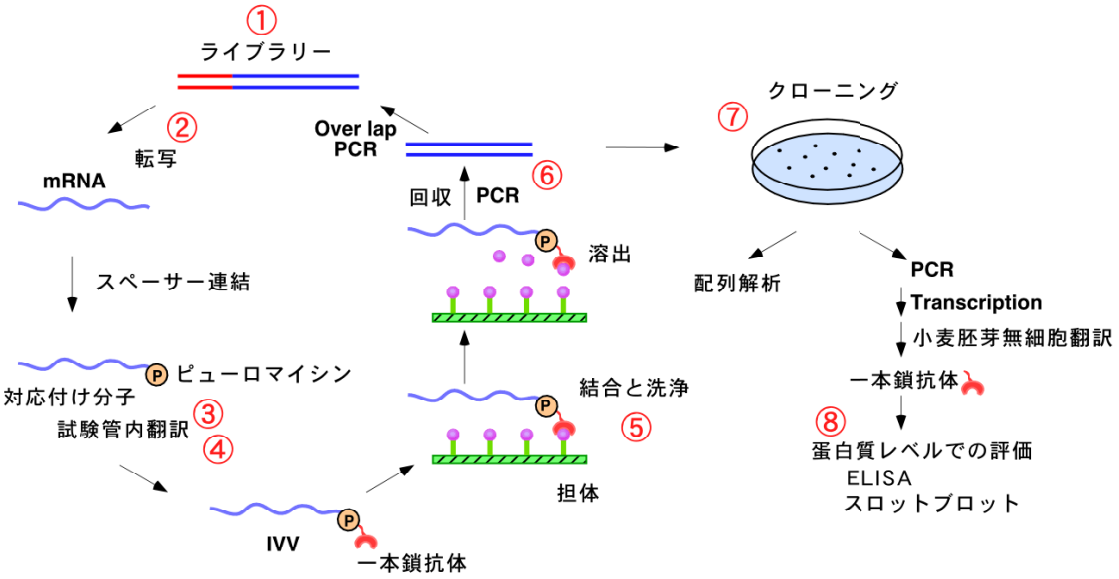
ヒトゲノムプロジェクトの進展により、それらの遺伝情報に基づいて医薬をデザインしたり、遺伝子の関与する病気の診断を行う、ゲノム創薬・ゲノム医療への期待・関心が高まっている。ゲノム創薬において、標的タンパク質が同定された後、最も早い臨床応用として期待されているのが抗体である。抗体の抗原（標的タンパク質）に対する高い特異性と親和性は、診断薬・治療薬への応用はもちろん、生化学的基礎研究における利用など、その応用範囲は極めて広い。特に、特異性の高いモノクローナル抗体はその利用価値が非常に高い。例えば、ゲノム医療において、近年、DNA マイクロアレイ（DNA チップ）が脚光を浴びているが、DNA マイクロアレイでわかる mRNA 発現パターンは必ずしもタンパク質の発現パターンと一致しないことが知られており、また、タンパク質の翻訳後修飾等の情報にも対応できないため、タンパク質の発現パターンを直接検出できる抗体マイクロアレイ（プロテインチップ）の開発に期待が集まっている。そのためには、特異性・親和性の高い抗体をいかに効率よく調製できるかが世界的に重要な課題となっている。

現在のモノクローナル抗体の調製法としては、細胞融合法（ハイブリドーマ技術）が主流である。しかし、この細胞融合法は非常に手間がかかる上に、高価な試薬を必要とし、また時間がかかる（約１年間）。さらに、動物の免疫操作が必要であるため、自己抗原や毒物に対する抗体を選択することが難しいといった種々の問題を有している。最近、これらの問題を解決する方法として、ファージディスプレイ法やリボソームディスプレイ法がモノクローナル抗体の選択に利用されている。すなわち、大きな多様性を有する抗体ライブラリー（cDNA 等）を構築し、目的とする抗体（対応付け分子）の選択、濃縮を繰り返すことによって、比較的容易に目的とする抗体を得ることができる。しかしながら、これらの技術においても、まだいくつかの欠点がある。ファージディスプレイ法は、現実的な DNA ライブラリーの上限が細胞を用いるため 10^8 程度と小さく、また、大腸菌にとって毒性をもつ抗体は選択されてこない等のバイアスがかかることもあり、目的とした機能による選択が成功しない可能性がある。また、リボソームディスプレイ法は無細胞翻訳系を用いた完全な *in vitro* の実験系であるためこれらのバイアスはかからず、また、ライブラリーの上限は 10^{10}-10^{11} が可能とされている。しかし、mRNA-タンパク質-リボソーム三者複合体が不安定なため、バイオパニング操作中に、mRNA とタンパク質が離れてしまうといった問題がある。

経費受給機関の代表者である慶應義塾大学の柳川らは、これらの欠点を克服する手法として

″*in vitro* virus（IVV）″の構築に世界に先駆けて成功した(FEBS Lett., 1997)。この方法では、mRNA の 3’ 末端にピューロマイシンを結合し、それを鋳型として無細胞翻訳反応を行うことにより、タンパク質と mRNA がピューロマイシンを介して共有結合した単純な RNA-タンパク質連結分子が構築される。この連結分子を用いて、タンパク質の機能を *in vitro* で選択した後、逆転写 PCR により遺伝子を増幅し、塩基配列解析することにより、タンパク質のアミノ酸配列を解読することができる。実際に、柳川らは異なるタイプの抗原として、癌抑制遺伝子 p53 タンパク質や癌遺伝子産物 MDM2 タンパク質に対する IVV 法による抗体選択を検討した結果、選択実験時に強い選択圧を加えることで、他法では認められない極めて高い濃縮効果が得られ、さらに、得られた抗体は安定性、活性、発現量等に優れていることがわかった。本実験条件の他法への適応は実質不可能であると考えられ、コスト、スピード、労力的な観点から IVV 法がいかに抗体選択に適しているかが証明された。

IVV 法による抗体選択システムは、ライブラリーからの抗体選択工程（①-⑥）、濃縮された遺伝子群のクローニングと塩基配列の解析工程（⑦）、得られたサンプルの評価（親和性、発現量等）工程（⑧）の３つからなる。今回我々が開発の対象とするのは、IVV 抗体ライブラリーの調製（①-④）と抗体選択工程（⑤-⑥）である。



抗体選択の工程図

以下、各工程の詳細を説明する(特許出願済)。

①：マウス脾臓由来 mRNA から RT-PCR 法により重鎖可変領域(VH)と軽鎖可変領域(VL)のそれぞれのライブラリーを調製後、ポリペプチドリンカーを介し直列に連結させ一本鎖抗体 cDNA ライブラリーを作製する。

②：①で調製した cDNA ライブラリーを試験管内転写(キット)によって mRNA とし、精製後、mRNA の 3’末端とピューロマイシンが結合した PEG(ポリエチレングリコール；分子量 2,000)スペーサーを RNA リガーゼで結合させ、精製する。

③：②で調製した mRNA-PEG ライブラリーを無細胞翻訳系で翻訳し、IVV ライブラリーとする。

④：IVV ライブラリーを Sephadex G-200 でゲル濾過を行う。

⑤：抗原を結合させた樹脂に IVV ライブラリーを結合させ、洗浄バッファーならびに低濃度の抗原を含む洗浄バッファーで非結合物質を十分洗い流す。

⑥：抗原で溶出し、RT-PCR で抗原結合能のあるライブラリーとして回収し、さらに PCR により元

のサイズの cDNA ライブラリーに再構築する。
①からの操作の繰り返し。

これら工程はすべての選択効率の精度を決めてしまうといっても過言ではないため、初年度から２年間はこれらの工程の自動化システムの開発を行う。実際にこれらの工程をマニュアルで行った場合の延べ日数は、４ないし５つの抗原に対して４－６日を要するが、本共同研究では、一度に多数の抗原に対する抗体選択を短期間で完了可能にするハイスループットな自動化システムの開発を目指す。

２．研究計画

本共同研究開発では、慶應義塾大学が IVV 法を用いた抗体選択の基本操作の設定と完成したロボットでの選択実験および精度を上げるための微調整等を担当する。池田理化社は、抗体選択の自動化ロボット(１号機)と精製の自動化ロボット(２号機)の設計と組み立て、作動確認を担当する。ゾイジーン社は抗体選択に用いる小麦胚芽の無細胞抽出液の大量調製と選択された抗体の大量調製を担当する。

抗体選択の自動化システムの開発のような多様なノウハウを必要とする研究開発においては、異業種のモノづくりの知力を最大限に結集・発揮する必要がある。抗体選択の自動化システムの開発を目指して、抗体選択の基盤技術、ロボット設計・組み立て技術、小麦胚芽無細胞抽出液の調製・応用技術をもっている３者（慶大、池田理化社、ゾイジーン社）が共同で研究を行う。

年次計画

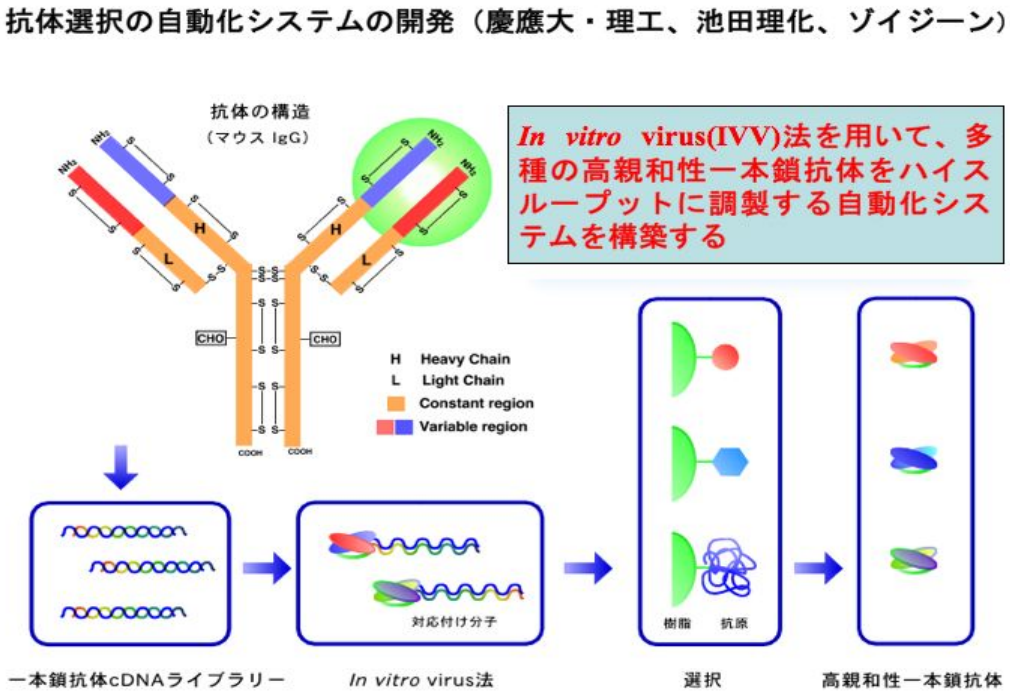
（百万円）

共同研究の実施機関	１年度目	２年度目	３年度目
慶應義塾大学	抗体選択の基本操作の設定 → ５２.０	ロボットでの作動確認実験と評価 → ５７.２	基本操作の改良､ロボットでの作動確認実験と評価 → ５１.４
（株）池田理化	選択ロボット(1 号機)の設計と組み立て → １５.３	1 号機の作動確認と精製ロボット(２号機)の設計と組み立て → 18.0	２号機の作動確認と１号機と２号機の微調整 → １５.１
ゾイジーン（株）	抗体の選択に適した小麦胚芽抽出液の調製 → １０.０	抗体の選択に適した小麦胚芽抽出液の調製 → １０.０	抗体の大量調製法の開発とそれを用いた大量調製 → １０.０

３．共同研究の目標

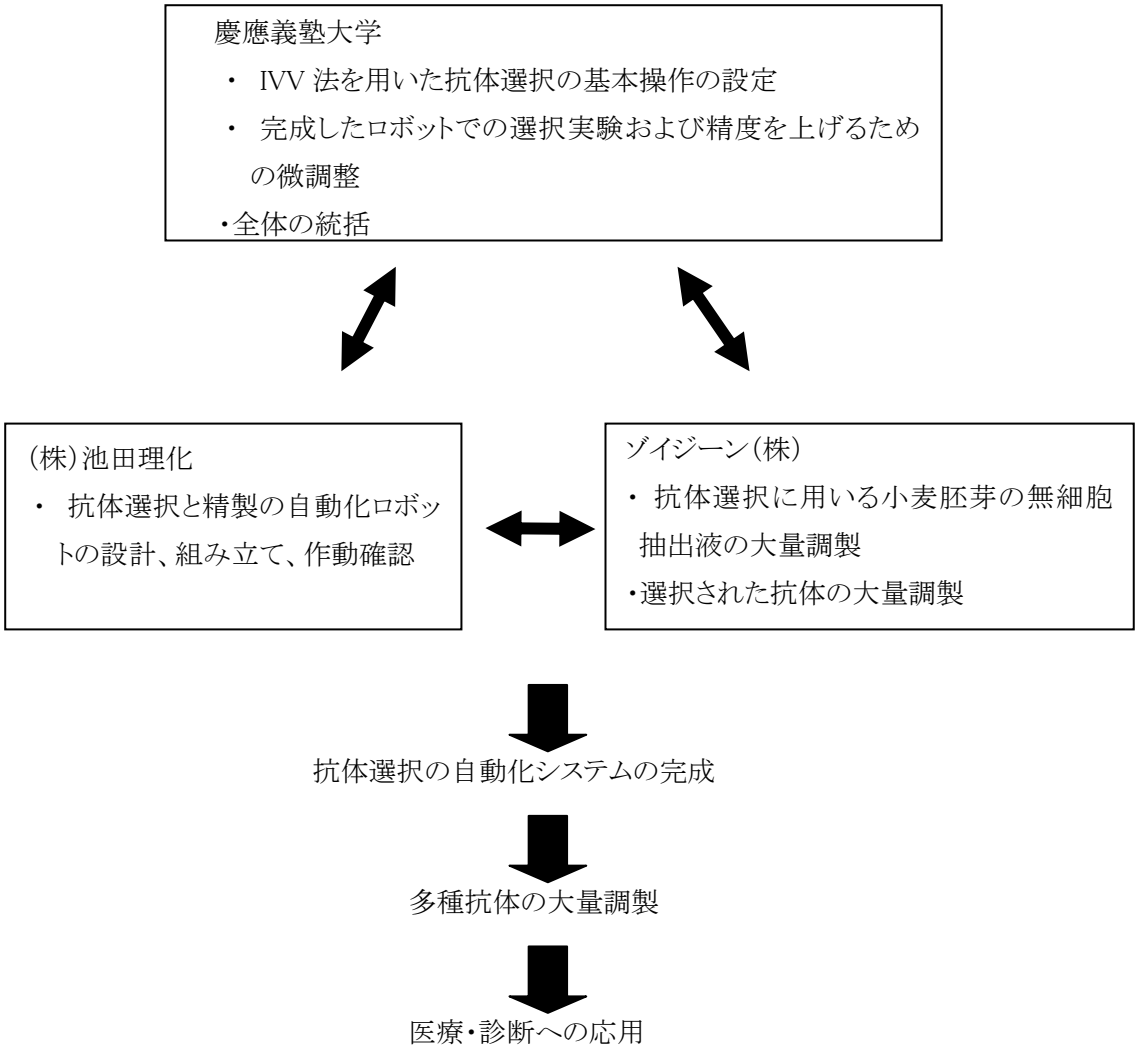
本共同研究開発の目標は、*in vitro* virus 法（IVV 法）に基づき、多種の高親和性一本鎖抗体を迅速に調製する技術を開発することにある。IVV 法はタンパク質とそれをコードする核酸(mRNA)を連結した遺伝子型と表現型の対応付け分子のライブラリーを試験管内で構築する技術であり、この技術を用いると、抗原分子に特異的に結合する一本鎖抗体を、細胞を使わずに迅速かつ簡便に選択することができる。現在、この工程をマニュアルで行った場合の延べ日数は、４ない５つの抗原に対して４－６日を要する。本共同研究では、これらの工程を自動化し、一度に多数の抗原に対する抗体選択を短期間で完了することができるハイスループットなシステムの開発を目指す。

４．研究全体像


抗体選択の自動化システムの開発（慶應大・理工、池田理化、ゾイジーン）
抗体の構造
（マウス IgG）
H Heavy Chain
L Light Chain
Constant region
Variable region
In vitro virus(IVV)法を用いて、多種の高親和性一本鎖抗体をハイスループットに調製する自動化システムを構築する
対応付け分子
樹脂
抗原
一本鎖抗体cDNAライブラリー
In vitro virus法
選択
高親和性一本鎖抗体

5．研究体制：

抗体選択の自動化システムの開発の共同研究体制



実施体制一覧

研　究　項　目	担当機関等	研究担当者
（調整費受給機関） 1. *In vitro* virus(IVV)法による抗体選択の基盤技術の開発	慶應義塾大学理工学部 慶應義塾大学理工学部 慶應義塾大学理工学部	◎柳川　弘志（教授） ○土居　信英（専任講師） 田畠　典子（専任講師）
（民間共同研究機関） 1. 抗体選択ロボットの設計・開発	株式会社 池田理化 株式会社 池田理化 株式会社 池田理化	○渡辺　克彦（営業企画グループ 課長） 川橋　裕子（商品開発グループ） 荒木　望（商品開発グループ）
2. 抗体選択に適した小麦胚芽無細胞抽出液の開発	ゾイジーン株式会社 ゾイジーン株式会社	○渋井　達郎（タンパク質合成事業部長） 三沢　悟（タンパク質事業部グループマネージャー）

◎　代表者

○　サブテーマ責任者

Ⅱ．経費

１．所要経費

（直接経費のみ）　　（単位：百万円）

研　究　項　目	担当機関等	研　究 担当者	所要経費			
			H16 年度	H17 年度	H18 年度	合計
（調整費受給機関） 1. *In vitro* virus(IVV)法による抗体選択の基盤技術の開発	慶應義塾大学理工学部	柳川弘志	40	44	39.5	123.5
所　要　経　費　（合　計）			40	44	39.5	123.5
（民間共同研究機関） 1. 抗体選択ロボットの設計･開発	株式会社池田理化	渡辺克彦	15.3	18.0	15.1	48.4
2. 抗体選択に適した小麦胚芽無細胞抽出液の開発	ゾイジーン株式会社	渋井達郎	10	10	10	30
所 要 経 費　　（合　計）			25.3	28.0	25.1	78.4

２．使用区分

【調整費受給機関】　　（単位：百万円）

	サブテーマ１	計
設備備品費	5.8	5.8
試作品費	0	0
消耗品費	80.9	80.9
人件費	36.7	36.7
その他	0.1	0.1
間接経費	37.1	37.1
計	160.6	160.6

※備品費の内訳（購入金額５百万円以上の高額な備品の購入状況を記載ください）

【装置名：購入期日、購入金額、購入した備品で実施した研究テーマ名】

①蛍光プレートリーダー装置：2005 年 1 月，5.7 百万円，サブテーマ 1

【民間共同研究機関】　　（単位：百万円）

研究参画機関名	サブテーマ 2(池田理化)	サブテーマ 3(ゾイジーン)	計
設備備品費	0	0	0
試作品費	33.4	10.0	43.4
消耗品費	15.0	20.0	35.0
人件費	0	0	0
その他	0	0	0
計	48.4	30.0	78.4

Ⅲ．研究成果

１．研究成果の概要

本共同研究は、*in vitro* virus 法（IVV 法）に基づき、多種の高親和性一本鎖抗体を迅速に調製する技術を開発することを開発の目標とし、慶應義塾大学は *in vitro* virus（IVV）法による抗体選択の基盤技術の開発、池田理化社は抗体選択と精製ロボットの設計と組み立て技術の開発研究、ゾイジーン社は抗体選択に適した小麦胚芽無細胞抽出液の開発研究をそれぞれ担当した。本研究においてはそれぞれの研究機関が有機的に連携し調整しながら研究を推進した。すなわち IVV 法による抗体選択の基盤技術を元に、ロボット化に適した選択実験系の再構築を実施した。また、自動化ロボットは「洗浄工程、溶出工程」を行う抗体選択ロボットと、それ以外の「核酸（転写産物・PCR 産物など）精製」を行う精製ロボットの２機を開発した。ゾイジーン社が開発した小麦胚芽無細胞抽出液は IVV 法での高い対応付け効率を達成した。これらを組み合わせ実際に IVV 法による抗体選択を本自動化ロボットで実施した。その結果、高親和性、高選択性を示す一本鎖抗体を選択することができ、本研究の目標を達成した。

（１） 研究目標と目標に対する結果

①目標：IVV 法を用いた抗体選択技術を自動化し、一度に多数の抗原に対する一本鎖抗体の選択を短期間で完了可能にするハイスループットシステムの基本システムを確立する。構築した基本システムでの選択実験と得られた抗体の評価を行う。さらに、精度を上げるための基本システムの微調整と抗体の大量スクリーニングと大量調製を実現する（慶應義塾大学)。

結果： IVV 法による抗体選択システムは、ライブラリーからの抗体選択工程、濃縮された遺伝子群のクローニングと塩基配列の解析工程、得られたサンプルの評価（親和性、発現量等）工程の３つからなる。今回我々が開発の対象とするのは、抗体選択工程と IVV 抗体ライブラリーの調製である。慶應義塾大学ではこれら抗体選択の６段階の作業工程の内、「洗浄工程、溶出工程」ロボット、「核酸（転写産物・PCR 産物など）精製」ロボット、の２機の設計開発にあたりロボット化に適した選択実験系の再構築を実施した。 「洗浄工程、溶出工程」ロボットでは新たに開発された専用のカラムを使い実験プロトコルの見直しや改良が必要とされた。本ロボットについて、実際のマウスの抗体の cDNA ライブラリーを使いマニュアルによる実験との比較し調整を行った。その結果ロボットで選択の実験が稼動し DNA を回収できることが分かった。とくにロボットはマニュアルに比較し非常に効率的に洗浄が行われていることが分かった。溶出工程はソフトフェアーの開発によりマニュアルと同レベルの効率を達成した。また、制作された核酸精製ロボットに関しても微調整を行い、カラムを２４個装着時に吸引ポンプの圧力調整により、遠心力精製と同等の PCR 反応用の核酸の精製ができた。

小麦胚芽無細胞翻訳系の検討として共同研究機関のゾイージーン社が開発した翻訳系は IVV 対応付け分子形成効率が従来のものより向上し、再現性が良好であった。さらに同社と共同で、酸化型および還元型グルタチオン存在下における透析法での翻訳システムについて検討を行った。我々は従来高比活性な一本鎖抗体を得るために大腸菌を用いてペリプラズムに発現させてきたが、本システムはそれとほぼ同等の比活性を確認することができた。さらにペリプラズム発現に比べて容量あたり約 *1000* 倍の発現量を得ることができた。

以上の成果を組み合わせ、実際に IVV 法による抗体選択を本自動化ロボットで実施した。その結果、高親和性、高選択性を示す一本鎖抗体を選択、大量調製することができ、本研究の目標を達成した。

②目標：慶應義塾大学で開発された IVV 法による高親和性一本鎖抗体の選択技術をもとに、その工程の自動化を図るための装置の開発、設計、制作、および制御ソフトウエアの開発、設計、制作を行う（池田理化社)。

結果：池田理化社が設計開発を行う抗体選択と核酸精製の自動化ロボットは、モジュールごとに作業を分担させるシステムを採用した。抗体選択の６段階の作業工程の内、既存の技術では困難と思われる IVV 抗体ライブラリーから、レジンに固定化した抗原に高親和性をもつ抗体の選択を実施する「洗浄工程、溶出工程」ロボット、及び PEG スペーサーを連結させた mRNA（mRNA-PEG ライブラリー）の精製などを実施する「核酸（転写産物・PCR 産物など）精製」ロボット、の 2 機を開発した。

「洗浄工程、溶出工程」には、微量のアガロースビーズに結合したサンプルを大量のバッファーで洗浄する操作がある。本装置では、独自に開発した専用のカラム内でバッファーを吸排することで、内部に入れたアガロースビーズを洗浄するようにした。分注および上述のカラムを装着するヘッドは、6 連を採用し、チップの自動装脱着を可能とした。カラムの輸送ユニットは独自のラックに計 24 本のカラムを立てた状態で装置内を移動できるようにした。また、バッファー類の分注は、前述の分注ヘッドとは別に本体横に設置したボトルより加圧圧送して 6 連ノズルからも供給することができるようにした。制御用のソフトウエアも自社で開発を行った。

③目標：IVV 法に基づき、多種の高親和性一本鎖抗体選択に適した小麦胚芽抽出液の製造技術の開発およびその抽出液を用いた一本鎖抗体の最適な合成法の開発を行う（ゾイジーン社)。

結果：　ゾイジーン社では無細胞*タンパク質*合成用小麦胚芽抽出液を大量に取得するために胚芽の選別工程の至適化ならびに抽出液調製条件の至適化を達成した。また小麦胚芽抽出液の品質向上の実現、抗体選択に適した小麦胚芽抽出液の調製方法の最適化について検討を行った。従来の小麦胚芽抽出液製造工程においては小麦胚芽の選別が煩雑で長時間を要する工程であったが、安価な小麦胚芽選別工程を確立することにより、従来の小麦胚芽抽出液に比べて製造コストを下げることが可能となった。また、従来品に比べて短時間の*タンパク質*合成活性は同等であることが確認されたことから IVV 法による抗体選択に適した安価な小麦胚芽抽出液としての応用が可能となった。事実、ゾイジーン社の独自技術により開発した小麦胚芽抽出液は他社品に比べて、IVV 法による対応付け効率が高く、高分子量*タンパク質*の合成も可能であることが判明した。本小麦胚芽抽出液を慶應義塾大学に供与して、その性能を調べたところ、抗体選択自動システムにおいても、IVV の対応付け効率が高いことが判明した。小麦胚芽無細胞*タンパク質*合成系による一本鎖抗体の合成検討を開始し、活性のある抗体が十分量合成可能であることを確認した。

（２）共同研究の目標に対する達成度

本プロジェクトにおける慶應義塾大学の目標は、我々独自の技術である IVV 法を用いて、様々な抗原に対する高親和性一本鎖抗体をマウスの抗体 cDNA ライブラリーから非常に迅速に選択するハイスループットシステムの基本操作の設定である。上述したように、本共同研究の目標達成度についてはかなり達成されたと考えている。本プロジェクトでは、ツールの開発が主なので、基礎研究のレベルに留まらず、即、実用化可能なレベルまで技術レベルを引き上げるように努力した。本プロジェクト研究の成功には、様々な技術・方法論をもつ３つのグループ間の協力と密接な交流が不可欠であり、代表者の指導性の発揮がきわめて重要かつ効果的である。３年間、それぞれ独自の技術をもつ３つの研究グループが有機的に連携することによって、新しい技術的基盤を確立することができた。具体的には、慶應義塾大学が開発した IVV 法を用いた遺伝子型と表現型の対応付け技術により、ゾイジーン社の高効率な小麦胚芽の無細胞タンパク質合成系と池田

理化社のロボット技術とを結びつけることにより、抗体選択の自動化システムの完成が可能になった。

（３）当初計画どおりに進捗しなかった理由

（４）科学的・技術的価値について

基礎生命科学分野において、モノクローナル抗体が必須である実験は多いが、現在モノクローナル抗体の調製は細胞融合法が主流であり、この方法は非常に時間（約 1 年）とコスト（100 万円程度）がかかるため、思うように研究が進められないことが大きな問題となっている。抗体を安価に大量に供給するシステムが確立すると、これらの問題は解消され、多くの生命科学研究分野への多大な貢献が期待できる。

（５）科学的・技術的波及効果について

細胞生物学や分子生物学などの基礎生命科学分野において、モノクローナル抗体が必須である実験はきわめて多い。競争の激しいバイオ研究の最前線では、新しい遺伝子産物に対する良質の抗体をライバルよりも早く手に入れられるかどうかが、勝敗の鍵を握っているとも言われる。しかしながら、現在モノクローナル抗体の調製は、細胞融合法が主流であり、この方法は非常に時間（約 1 年）とコスト（100 万円程度）がかかるため、思うように研究が進められないことが大きな問題となっている。

また、多種類の抗体を基板上に高密度に固定化した抗体チップの開発は、プロテオーム解析などの基礎科学や医療・診断への応用面に多大な貢献が期待できる。例えば、O-157 や、SARS のような高感度でスピーディーな診断を必要とする疾患の検出に有効である。あるいは、内分泌攪乱物質等の微量毒物の検出試薬へも応用できる。また、厳密な臨床診断などにかぎらず、健康モニターや簡単な食品検査のような日常的な用途にも期待ができる。しかしながら、抗体の作製工程が律速になっており、特異性と親和性の高い抗体をハイスループットに得ることができるシステムの構築が必要不可欠である。これまで、細胞融合法で作製するモノクローナル抗体やファージディスプレイによる一本鎖抗体では、今のところ数千～数万の良質な抗体をハイスループットに得られるまでには至っていない。

本共同研究による良質の抗体を安価に大量に供給するシステムの確立は、多くの基礎研究分野からさまざまな応用分野への多大な貢献が期待できる。

事業化する製品・サービス等については次のように考えている。

(1) 内容

本研究開発により確立された高親和性抗体作出技術を利用して

１）新規に取得された抗体を用い，細胞レベルでの機能解析を実施し、生理学的作用が未知のタンパク質生体内での作用部位、作用メカニズムの情報を得、医薬・診断メーカーへの情報のライセンスを実施する。

２）新規に取得された創薬・診断候補タンパク質について，治療用抗体あるいは診断用抗体チップを作成し，医薬・診断メーカーへライセンスを実施する。

(2)　用途（販売予定先）

国内外における医薬・診断メーカーへライセンス事業

（６）社会的・経済的波及効果について

ゲノムビジネス市場、特にバイオ医薬品を中心とした医療分野における市場は、2006 年は約7500 億円で、04 年から２年間で年平均約７％で伸びた。2010 年は約 9500 億円で年平均成長率は５％と予測されており、最も有望な分野と考えられている。さらに興味深いことに、ゲノムビジネス分野で得られる研究成果は、合成医薬を含む医薬ビジネス市場の拡大に直結する。

本研究開発では、IVV 法という日本発の独自の基盤技術を用いる。これらの技術を実用化し、課題となるハイスループット化・マイクロ化等の技術を取り込んで完成することにより、ゲノムビジネスから医薬ビジネスへの連携に必要不可欠な技術に成長するものと考えている。本共同研究の高親和性抗体の選択技術を利用した抗体医薬や診断試薬は、より早いアウトプットが期待できる。特に抗体医薬の 2006 年の売り上げは 799 億円で、2016 年には 2500 億円市場（対 06 年比 313%増、年平均成長率は 12%）になると予測されている。高親和性抗体は、高感度でスピーディーな診断を必要とする疾患（例えば、狂牛病や細菌、ウイルス疾患等）の診断薬や内分泌撹乱物質等の微量毒物の検出試薬、また、抗体マイクロアレイ（プロテインチップ）等への応用も期待できる。このように大きな市場の可能性をもつゲノム創薬、ゲノム医療の分野で、本研究開発で実用化されるオリジナルな技術を武器とすれば大きな波及効果が期待できる。

（７）民間企業との役割分担及び産学官での共同研究によって得られた効果について

生物工学系の研究者は自らの手で、その必要性に応じた先端的な装置を開発することは困難である。また試薬メーカーの提供する試薬を研究の必要性にあわせて改良してもらうことも簡単なことではない。一方開発メーカーも先端的な研究を詳細に理解し、個々の研究者の必要性に対応した装置開発に着手することは多くはなかった。しかしながら本共同研究では３者の立場と専門を異にする研究者と技術者が意見を出し合い、議論を重ねていった。その結果、研究の必要性に合わせた装置の実現が可能となった。さらに、それぞれの専門の相互理解が促進されたものと考えられる。また今後の装置開発の方向性や次世代機開発目標のなどにも効果があった。これらの点から本共同研究により完成度の高い装置を実現することができたと考えられる。

（８）研究成果の発表状況

１）研究発表件数

	原著論文発表(査読付)	左記以外の誌面発表	口頭発表	合計
国　　内	0 件	0 件	9 件	9 件
国　　外	1 件	1 件	11 件	13 件
合　　計	1 件	1 件	20 件	22 件

※ 国内の出版社の英文誌は「国内」とする。

※ 国内で開催された国際会議は「国外」とする。

２）特許等出願件数：国内　1 件、国外　0 件、合計　1 件

３）受賞等：

該当なし

４）原著論文（査読付）

【国内誌】(国内英文誌を含む)

該当なし

【国外誌】

In vitro evolution of single-chain antibodies using mRNA display. Fukuda I, Kojoh K, Tabata N, Doi N, Takashima H, Miyamoto-Sato, E., Yanagawa, H. Nucleic Acids Res.,34, e127 (2006)

５）その他の主な情報発信（一般公開のセミナー、展示会、著書、Ｗｅｂ等）

1. 川橋裕子、第 4 回 国際バイオ EXPO（2005 年 5 月 17 日～19 日）へ抗体選択ロボット 1 号機を出展、

説明

2. 川橋裕子、BioJapan 2005 （2005 年 9 月 7 日～9 日）で、横浜市ブース内セミナーにて、制作した抗体

選択ロボットに関して講演

２．研究成果：サブテーマ毎の詳細

（１）サブテーマ１： *In vitro* virus（IVV）法による抗体選択の基盤技術の開発

（分担研究者名：柳川弘志、土居信英、田畠典子、所属機関名：慶應義塾大学）

１）要旨

IVV 法による抗体選択システムは、ライブラリーからの抗体選択工程、濃縮された遺伝子群のクローニングと塩基配列の解析工程、得られたサンプルの評価（親和性、発現量等）工程の３つからなる。今回我々が開発の対象とするのは、抗体選択工程と IVV 抗体ライブラリーの調製である。慶應義塾大学ではこれら抗体選択の６段階の作業工程の内、「洗浄工程、溶出工程」ロボット、「核酸（転写産物・PCR 産物など）精製」ロボット、の２機を設計開発にあたりロボット化に適した選択実験系の再構築を実施した。また小麦胚芽無細胞翻訳系の検討も実施し、共同研究機関のゾイージーン社が開発した翻訳系の検討では IVV 対応付け分子形成効率が従来のものより向上した。さらに同社と共同で実施した酸化型および還元型グルタチオン存在下における透析法での翻訳システムは、従来の大腸菌を用いたペリプラズムに発現系とほぼ同等の比活性を確認することができだけでなく、ペリプラズム発現に比べて容量あたり約 *1000* 倍の発現量を得ることができた。

以上の成果を組み合わせ、実際に IVV 法による抗体選択を本自動化ロボットで実施した。その結果、高親和性、高選択性を示す一本鎖抗体を選択することができ、本研究の目標を達成した。

２）目標と目標に対する結果

目標：IVV 法を用いた抗体選択技術を自動化し、一度に多数の抗原に対する一本鎖抗体の選択を短期間で完了可能にするハイスループットシステムの基本システムを確立する。構築した基本システムでの選択実験と得られた抗体の評価を行う。さらに、精度を上げるための基本システムの微調整と抗体の大量スクリーニングと大量調製を実現する。

結果：「洗浄工程、溶出工程」ロボット、「核酸（転写産物・PCR 産物など）精製」ロボット、の２機に適した選択実験系の再構築行い、本自動化ロボットで IVV 法による抗体選択を行った結果、高親和性、高選択性を示す一本鎖抗体を選択することができ、本研究の目標を達成した。

３）研究方法

① 抗体選択の基本操作の設定

【１】抗体選択自動化「洗浄工程、溶出工程」を行うロボットの基本操作の設定として、独自に開発したミニカラムとシリンジが一体に成型したカラムを実際に装着した実験を行った。また mRNA の分解や PCR の阻害等が生じた点についてはオートクレーブ滅菌、あるいは、DEPC(diethylpyrocarbonate)処理水を用いてこれらを解消させること検討した。

【２】「核酸（転写産物・PCR 産物など）精製」を行うロボットの検討として、工程⑥における PCR 後の精製の段階で従来のレジンを使ったシステムからロボット化にし易いスピンカラム等の方法を検討した。

【３】共同研究機関のゾイージーン社が開発した小麦胚芽無細胞翻訳系をもちいて IVV 対応付け分子形成効率の検討を行った。さらに同社と共同で、酸化型および還元型グルタチオン存在

下における透析法での翻訳システムについて検討を行った。また従来高比活性な一本鎖抗体を得るために大腸菌を用いてペリプラズムに発現させてきたが、本システムと比活性、発現量を検討した。

② ロボットでの選択実験と評価

抗体選択自動化「洗浄工程、溶出工程」を行うロボットを使って、実際にマウス一本鎖抗体 cDNA ライブラリーからの選択実験を行った。抗原としては癌抑制遺伝子産物であるヒトｐ５３タンパク質の C 末端領域ペプチドを用いた。既に検討し決定した洗浄条件により洗浄後、抗原ペプチドにより競争的に溶出させた。1mM、200ul のペプチド溶液を吸引し、レジンと懸濁させた状態を 1 時間保持させた後に溶出液を回収させた。またロボット動作プログラムを溶出時間ごとの分画が可能な様に改変後、溶出時間１５分から４５分の間の溶出液を回収させた。溶出液はそれぞれ RT-PCR にて DNA として回収させ、クローニング後配列解析を行い、文献報告の抗 p53-C 末一本鎖抗体との相同性を比較した。得られたクローンは、大腸菌由来の無細胞翻訳系の PURESYSTEM S-S を用いて翻訳後、ｐ５３タンパク質を認識できるかどうかについてウエスタンブロットによって評価した。

③ 精度を上げるための微調整

２つのロボットはいずれも一度に２４サンプル同時に処理できる装置を搭載している。これらの稼動精度に重点をおいて池田理化社と共同で微調整を行った。

【１】抗体選択自動化「洗浄工程、溶出工程」を行うロボットに関しては、選択実験の検討に際し、溶出を時間制御で分画可能なプログラムの導入を行った。洗浄方法については一回の吸引・吐出で洗浄液を交換する方法と、吸引・吐出を 3 回の繰り返した後に洗浄液を交換する方法で検討した。

【２】「核酸（転写産物・PCR 産物など）精製」を行うロボットに関しては、スピンカラムとしては QIAGEN 社の QIAquick PCR Purification Kit を用いて検討を行った。QIAquick のシステムは本来、遠心操作で DNA を回収するが、本ロボットでは減圧ポンプで吸引することで、各精製ステップの溶液を処理し、最終的には数十 ul の核酸を溶出し回収する。そこで本来のシステムのプロトコールによる遠心操作と同程度の濃度、及び純度と容量の核酸溶液が回収されることを目標に検討を行った。作動条件を変えて回収溶出液の定量、核酸の UV スペクトル測定、並びにアガロースの電気泳動による検証を行った。また 1 検体から 24 検体の同時処理が可能かどうかを検討した。

４）研究結果

①抗体選択の基本操作の設定

【１】抗体選択自動化「洗浄工程、溶出工程」を行うロボットの基本操作の設定として、独自に開発したミニカラムとシリンジが一体に成型したカラムは、従来のミニカラムのように洗浄液の吸引によりフィルターがはずれる問題点は完全に解消された。またレジン存在下の検討でも従来のようにミニカラムのロットごとに洗浄液の流速が異なる点についても解決した。また mRNA の分解や PCR の阻害等については一体成型カラムを DEPC 処理水に浸した状態下でのオートクレーブ処理が、カラムの歪みも無く、mRNA の分解や PCR の阻害等も見られなくなることが分かった。

【２】「核酸（転写産物・PCR 産物など）精製」を行うロボットの検討として、スピンカラム QIAGEN

社の QIAquick PCR Purification Kit を用いて容量や吸引圧力等を最適化した。
【３】共同研究機関のゾイージーン社が開発した翻訳系の検討では IVV 対応付け分子形成効率が従来のものより向上した。さらに同社と共同で実施した酸化型および還元型グルタチオン存在下における透析法での翻訳システムは、従来の大腸菌を用いたペリプラズムに発現系とほぼ同等の比活性を確認することができだけでなく、ペリプラズム発現に比べて容量あたり約 1000 倍の発現量を得ることができた。
②ロボットでの選択実験と評価
抗体選択自動化「洗浄工程、溶出工程」を行うロボットを使って、実際にマウス一本鎖抗体 cDNA ライブラリーからの選択実験を行った。選択実験によって得られたクローンが本来の抗原である ｐ５３タンパク質を認識できるかどうかについてウエスタンブロットによって評価したところ、約 10ng の ｐ５３タンパク質を認識することができた。これは文献報告の抗体とほぼ同程度の検出限界の活性を有していることが分かった。
③ 精度を上げるための微調整
【１】抗体選択自動化「洗浄工程、溶出工程」を行うロボットに関しては、溶出を時間制御で分画可能なプログラムの導入を行った。洗浄方法についてはレジンに対し 1000 倍容量の洗浄液を使って一回当たり 3 回の吸引・吐出を８回繰り返す洗浄方法が、今のところ最も効率的な洗浄効果を上げることができた。
【２】「核酸（転写産物・PCR 産物など）精製」を行うロボットに関しては、精製ステップ毎の各溶液の特性に応じ、ポンプによる吸引力、吸引時間を各々設定することにより、高濃度で純度の高い核酸溶液の回収が可能となった。

５）考察・今後の発展等
本共同研究開発における基盤技術である IVV 法はほぼ完成の域にあり，特許戦略もアイデアの根幹となる基本特許および周辺特許を出願および取得済みで、ワールドワイドに展開されている。また、本共同研究に関係する IVV 法による抗体選択法に関しても、特許を出願している。本研究開発において制作された抗体選択ロボットが順調に作動し、高親和性、高選択性の一本鎖抗体の迅速なスクリーニングが可能になった。それ故、ゲノム創薬や診断試薬のためのより具体的な抗体を選定することが可能な技術状況にある。最近、バイオベンチャーから一本抗体作製を委託された。本共同研究開発に提示された抗体は医薬や診断ビジネスにおける要求度も極めて高く，また、バイオビジネス市場の動向と競争力から本自動化システムを用いた抗体作製の事業化は可能であると判断している。

６）関連特許
基本特許（当該課題の開始前に出願したもので、当該課題の基本となる技術を含む特許）について
1.Molecular that homogizes genotype and phenotype and utilization thereof, US Patent:6,361,943 B1(2002), Mitsubishi Chemical Cor., H.Yanagawa, N.Nemoto, E.Miyamoto, Y.Husimi
IVV 法の米国での基本特許

2.遺伝子型と表現型の対応付け分子及びその利用，特許第 3683282 号(2005)，三菱化学株式会社，柳川弘志、根本直人、宮本悦子、伏見譲
IVV 法の日本での基本特許
3. 遺伝子型と表現型の対応付け分子及びその利用，特許第 3683902 号(2005)，三菱化学株式会社，柳川弘志、根本直人、宮本悦子、伏見譲
IVV 法の日本での基本特許
4. 翻訳テンプレートおよびそのライブラリー、それらから合成されるタンパク質およびタンパク質のライブラリー、ならびにそれらを構成する要素、ならびにそれらの製造方法および利用方法，国際公開番号：WO2003/106675(2003)，学校法人慶應義塾，宮本悦子、柳川弘志、高嶋秀昭
IVV 法における効率的な翻訳テンプレートとライブラリーの作製法に関する特許
5，高機能性タンパク質の迅速、高効率な選択方法、それによって得られる高機能性タンパク質、およびその製造方法と利用方法，国際公開番号:WO2005/035751(2005)，学校法人慶應義塾，柳川弘志、田畠典子、古城周久
IVV 法を用いた一本鎖抗体の選択方法に関する特許
6. 物質とタンパク質との間の相互作用の検出方法、物質と相互作用するタンパク質のスクリーニング方法、及び、物質とその物質と相互作用するタンパク質との複合体の形成方法，特許第 3706942 号，学校法人慶應義塾，柳川弘志、宮本悦子、松村展敬、土居信英、舘山誠一、石坂正道、堀澤健一
IVV 法を用いたタンパク質相互作用スクリーニングに関する特許

７）研究成果の発表
（成果発表の概要）

1. 原著論文（査読付き）	1 報　（筆頭著者：0 報、共著者：1 報）
2. 上記論文以外による発表	国内誌：0 報、国外誌：1 報、書籍出版：0 冊
3. 口頭発表	招待講演：3 回、主催講演：　0 回、応募講演：6 回
4. 特許出願	出願済み特許：0 件　（国内：　件、国外：　件）
5. 受賞件数	0 件

1. 原著論文（査読付き）
In vitro evolution of single-chain antibodies using mRNA display. Fukuda I, Kojoh K, Tabata N, Doi N, Takashima H, Miyamoto-Sato, E., Yanagawa, H. Nucleic Acids Res.,34, e127 (2006)

2. 上記論文以外による発表
Puromycin technology for proteome exploration using cell-free translation systems. Miyamoto-Sato, E. and Yanagawa, H.　Recent Devel. Nucleic Acids Res., 2, 163-173 (2006)

3. 口頭発表
国内
1. 田畠典子、佐久間裕子、本多由美子、鬼丸美智子、石原希未子、古城周久、高嶋秀昭、宮本悦子、柳川弘志、*In vitro* virus 法による一本鎖抗体の迅速な選択、第２８回日本分子生物学会年

会、福岡、2005
2. 福田伊佐央、古城周久、田畠典子、土居信英、高嶋秀昭、宮本悦子、柳川弘志、*In vitro* virus 法による高親和性一本鎖抗体の試験管内進化、第２８回日本分子生物学会、福岡、2005
3. 川橋裕子、古城周久、土居信英、田畠典子、津田千鶴、松村展敬、柳川弘志、一本鎖抗体を利用した抗体マイクロアレイ法、第２８回日本分子生物学会、福岡、2005
4. 田畠典子、*In vitro* virus(IVV)法を用いた抗体選択の自動化システムの開発、バイオジャパン、横浜、2005
5. 柳川弘志、*In vitro* virus(IVV)法によるタンパク質の多様な機能スクリーニング、第 21 回コンビケム研究会、東京、2005

国際
1. Tabata, N. and Yanagawa, H. Rapid *in vitro* selection and screening of mouse single-chain antibodies, IBC's Antibody Engineering, SanDiego, 2005
2. Rapid selection of mouse single-chain antibody with high affinity and selectivity by *in vitro* virus method. Tabata, N., Sakuma, Y., Honda, Y., Onimaru, M., Matsunaga, T., Takashima, H., Miyamoto-Sato, E., and Yanagawa, H. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, June, 2006
3. Development of microarrays immobilized affinity tagged single-chain Fv. Kawahashi, Y., Doi, N., Kojoh, K., Tabata, N., Tsuda, C., Matsumura, N., and Yanagawa, H. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, June, 2006
4. Construction of human naive combinatorial library for *in vitro* selaction of single-chain Fv antibodies. Koiso, T., Fukuda, I., Onimaru, M., Tabata, N., Doi, N., Takashima, H., and Yanagawa, H. . 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, June, 2006

4. 特許出願

	出願・公告等の日付	「発明の名称」	発明者氏名	出願人名	特許等の種類・番号
1)	表記すべきものは特になし				

*研究成果のどの部分の特許なのか、概要を記入してください。

5. 受賞件数
該当なし

（2）サブテーマ２：S 抗体選択の自動化ロボットの設計、組み立てと作動確認

（分担研究者名：渡辺克彦、川橋裕子、荒木望、　所属機関名：株式会社池田理化営業企画部）

１）要旨

弊社は本共同研究において、慶應義塾大学柳川弘志教授の *In vitro* virus 法（IVV）法による高親和性一本鎖抗体選択技術をもとに、その工程の自動化を図るための装置の開発、設計、製作および、制御用ソフトウェアの開発、設計、製作を担当した。初年度においては IVV 法の工程を熟知し、自動化する部分についての検討を行い、１号機（選択工程自動化装置）の設計および組み立てを行った。次年度は、一号機を用いて実際のスクリーニング操作を行い、ソフトウェアとの連携や動作そのものの不具合などを明らかにして改良を進めた。また同時に、２号機（DNA および RNA 精製自動化装置）の設計および組み立てを行った。最終年度は、二号機のソフトウェア-装置間の連携の微調整を行って改良を進め、抗体分子を選択して単離する工程について自動化を完了させた。

２）目標と目標に対する結果

弊社の本研究開発に置ける目標は、下記のように設定した。

１．IVV 法で目的の対応付け分子を選択する工程（親和性選択法）を自動化する装置の開発

２．IVV 法によるスクリーニング工程に含まれる DNA や RNA の精製を自動化する装置の開発

上記のそれぞれの目標に対して、結果は以下のようである。

1. 従来のマニュアル操作で使用していたアガロースビーズによる操作をそのまま自動化に移行する方法として、5ml の溶液を通すことができるオリジナルカラムを作成し、ビーズの洗浄・溶出のプロトコルを自動化装置用に改変し、自然落下方式のカラムを用いた選択工程自動化装置を完成させた。
2. IVV 法の工程には、対応付け分子（RNA）の精製とクローニングした配列（DNA）の精製のように核酸精製の工程が 2 箇所入る。市販の精製カラムのキットを利用してこれらの操作を自動化できる装置を製作し、完成させた。

３）研究方法

１．　選択工程自動化装置の開発（カラム使用）

IVV 法による抗体選択法では、微量のアガロースビーズに抗原を結合させ、それに対して高い親和性を持つ IVV 化された一本鎖抗体分子を親和性選択法によって選択する操作があり、この工程は高親和性抗体取得のための最も重要な工程の一つにあたる。本操作においては、大量の洗浄液で均一にアガロースビーズを洗浄し、さらに効率よく溶出を行う必要がある。本装置では、大量の洗浄液を使用するために独自に作製した 5ml チップとさらに同型のカラムを作製し、先端にシリンジ用のフィルターを装着できるようにした。バッファーを先端のフィルターを通して吸排することで、内部に入れたアガロースビーズを洗浄するようにした。しかし、ヘッドの先端に装着する既製品カラムのフィルターにロッド間でかなりのばらつきがあり、バッファーが通りにくいといった不具合があることがわかった。そのため、フィルター素材の検討を行い、さらに独自カラムの内部に直接フィルターを装着させたものを試作して検討を進めた。同時にバッファーの吸排速度についても繰り返し調整した。

分注および上述のカラムを装着するヘッドは、6 連を採用し、チップの自動装脱着を可能とした。カラムの輸送ユニットは、独自のラックに計 24 本のカラムを立てた状態で装置内を移動できるようにした。ラックは、積層することでカラム中のアガロースビーズから溶出されたサンプル

液を別容器に分注することができる。洗浄用バッファーは、6 連のノズル状の供給部から排出され、本体横に設置したボトルより加圧圧送される。カラムからの廃液は、ユニットごと廃液トレイ上部に移動して直接排出される。トレイ中の廃液は、本体底面より外部に設置した廃液ボトルに回収する。また、制御用ソフトウェアは、Windows OS 上で稼動する。ユーザーレベルで分注量・速度・操作回数などを設定でき、実験プロトコル変更に際してもフレキシブルに対応できるものを目指した。

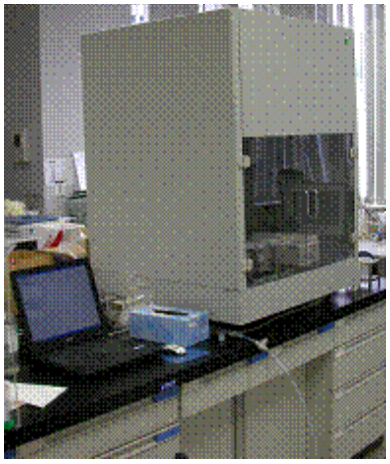
2.　DNA や RNA の精製を自動化する装置の開発（市販のスピンカラム用）

本装置は、既存の核酸精製用のスピンカラム（1.5ml スケールのチューブタイプ）に対応できるようにした。チューブは 24 本同時にセットでき、サンプルチューブに蓋が有る場合には、チューブラック上のつまみに蓋を固定できるようにした。通常のマニュアル操作では、スピンカラムは遠心機を用いて利用するが、本装置ではバキュームユニットを組込み、吸引によってカラム内の溶液を除去または回収する様式とした。24 本のカラムを使用しない場合は、バキュームの吸引力を保つ為にラックの使用しない部分にシリコン栓を挿入することとした。バキュームは異なる吸引力で数段階行う必要があることがわかり、当初はバルブ 1 個で対応していたが最終的には 3 個設置してチューニングを行った。バキュームの吸引力はバルブの開閉で調整し、その制御はソフトウェア上で行えるように設定した。

４）研究結果

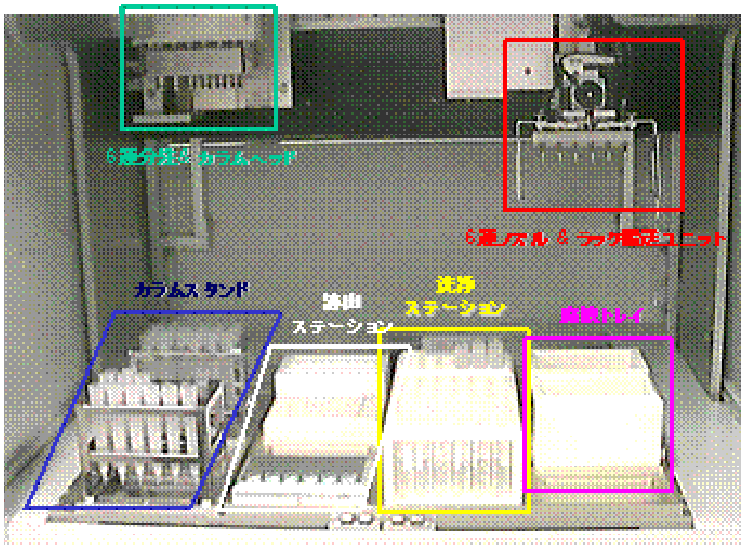
１．　選択工程自動化装置

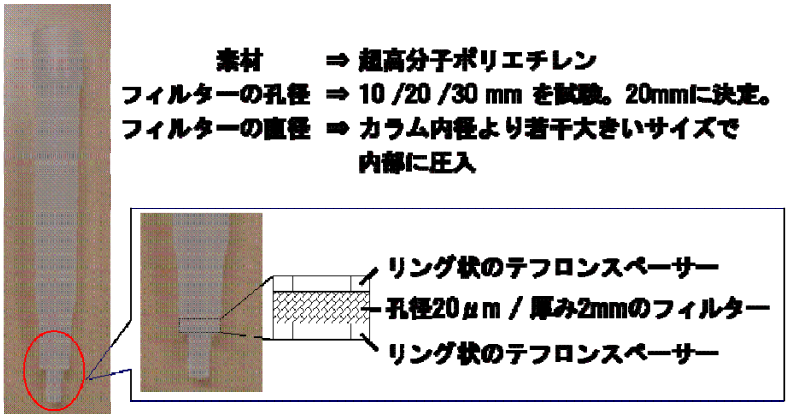
［ 概観 ］



1. 800×750×970 mm
2. AC 100V 駆動
3. 観音開きの大型アクリル扉
4. マイクロプレート１６枚分の積載面積
5. 24 本／プレート
6. ６連チップ（5ml & オリジナルカラムヘッド
7. ６連ノズル（加圧圧送）
8. ラック搬送ユニット（平面移動層）
9. 廃液排出ライン

［ 内部 ］

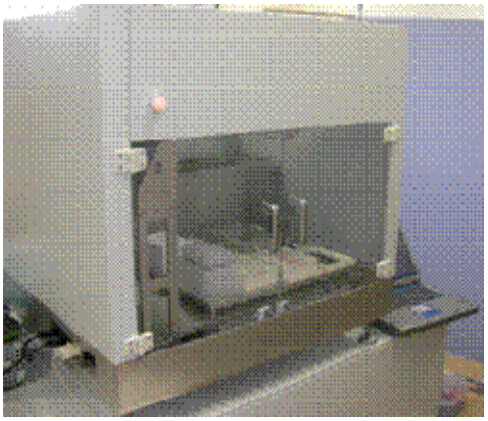




［ カラム ］

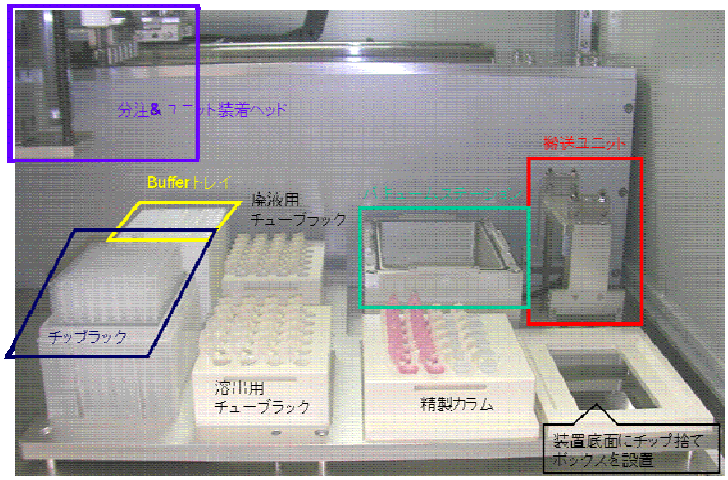
2． 核酸精製自動化装置

［ 概観 ］

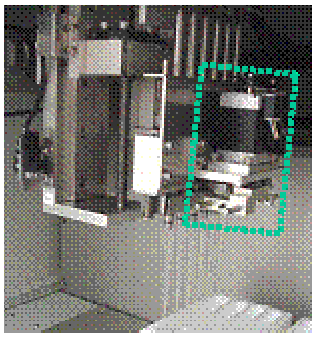
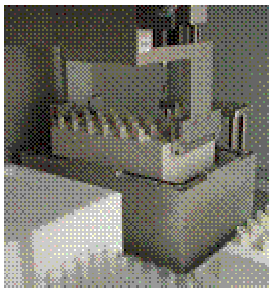
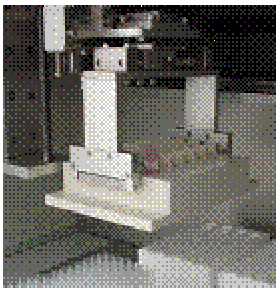
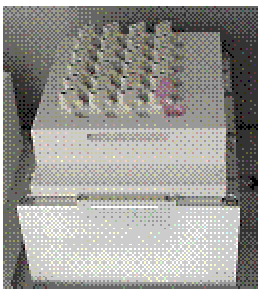


1. 800×700×800 mm
2. AC 100V 駆動
3. 観音開きの大型アクリル扉
4. 24 本／プレート
5. 6 連チップ（5ml）ヘッド
6. バキュームステーション
7. ラック搬送ユニット
8. 使用済みチップ入れ（装置底部）

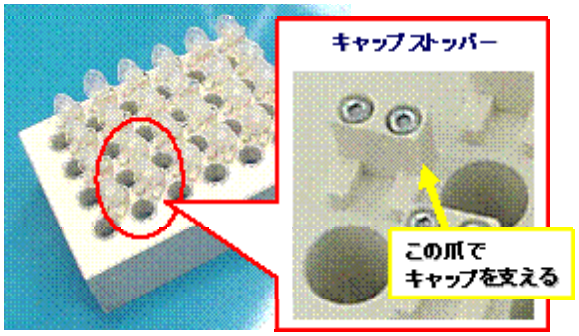
［ 内部 ］



［ ユニット動作 ］

［ チューブラック ］



［ バキューム調整用バルブ ］

５）考察・今後の発展等

IVV 法は、特定分子を単離手段する方法のほか、タンパク質間相互作用解析法としてもその利用が期待され、実際に他のプロジェクトでも成果が出ている手法であるが、多種類のサンプルを扱う上では操作工程の多さと煩雑性から特に自動化が重要課題であった。本研究開発により開発された装置の利用によって操作時間が短縮されたことにより、効率よい多種類の高親和性抗体取得に大きな期待ができる。

また、本課題で研究開発した装置は、IVV 法を用いた抗体選択法によらずその他の実験・研究へ応用することができる。１号機については、一般的なプルダウンアッセイ法やタンパク質の精製装置としてカスタマイズすることが容易にでき、これにより質量分析法の前処理装置として利用することも可能である。２号機については、本研究開発では QIAGEN 社製のスピンカラムを用いているが現在他社製品についても動作条件の検討を継続中である。QIAGEN 社については、独自に遠心機を組み込んだ自社製カラム用の自動化装置を本年に入ってから発表しているが、本開発装置については、他社製品も使用可能であることや国産装置としてカスタマイズが容易であることなど利点は大きいと考える。

６）関連特許

基本特許（当該課題の開始前に出願したもので、当該課題の基本となる技術を含む特許）について

表記すべきものは特になし

７）研究成果の発表

（成果発表の概要）

1. 原著論文（査読付き）	0 報　（筆頭著者：　報、共著者：　報）
2. 上記論文以外による発表	国内誌：0 報、国外誌：　報、書籍出版：　冊
3. 口頭発表	招待講演：1 回、主催講演：0 回、応募講演：3 回
4. 特許出願	出願済み特許：0 件　（国内：　件、国外：　件）
5. 受賞件数	0 件

1. 原著論文（査読付き）

該当なし

2. 上記論文以外による発表

該当なし

3. 口頭発表

国内

1. 川橋裕子、古城周久、土居信英、田畠典子、津田千鶴、松村展敬、柳川弘志、一本鎖抗体を利用した抗体マイクロアレイ法、第２8 回日本分子生物学会、福岡、2005

2. 川橋裕子、第 4 回 国際バイオ EXPO（2005 年 5 月 17 日～19 日）へ抗体選択ロボット１号機を出展、説明

3. 川橋裕子、BioJapan 2005 （2005 年 9 月 7 日～9 日）で、横浜市ブース内セミナーにて制作した抗体選択ロボットについて講演

国際

1. Development of microarrays immobilized affinity tagged single-chain Fv. Kawahashi, Y., Doi, N., Kojoh, K., Tabata, N., Tsuda, C., Matsumura, N., and Yanagawa, H. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, June,2006

4. 特許出願

	出願・公告等の日付	「発明の名称」	発明者氏名	出願人名	特許等の種類・番号
1)	表記すべきものは特になし				

*研究成果のどの部分の特許なのか、概要を記入してください。

5. 受賞件数

該当なし

（３）サブテーマ３：抗体選択に適した小麦胚芽無細胞抽出液の開発研究（ゾイジーン社）
（分担研究者名：渋井　達郎、三沢　悟、所属機関名：ゾイジーン株式会社*タンパク質*合成事業部）

１）要旨

ゾイジーン社では IVV 法に基づき、多種の高親和性一本鎖抗体選択に適した小麦胚芽抽出液の製造技術の開発及びその抽出液を用いた一本鎖抗体の最適な合成方法の開発について鋭意検討した。その結果、IVV 法によるハイスループットな抗体選択システムに適応可能な安価な小麦胚芽抽出液の製造法を確立した。また、小麦胚芽無細胞*タンパク質*合成系の初期還元状態及び酸化速度等を制御することにより一本鎖抗体の分子内ジスルフィドの形成および高いタンパク質合成量を維持した無細胞合成法を確立し、本共同研究開発達成に大きく寄与した。

２）目標と目標に対する結果

本共同研究開発におけるゾイジーン社の目標は抗体選択に適した小麦胚芽抽出液の製造法確立及び一本鎖抗体の合成に適した小麦胚芽無細胞タンパク質合成方法の開発である。無細胞タンパク質合成用小麦胚芽抽出液を大量に取得するための調製条件の至適化と調製した小麦胚芽抽出液による無細胞*タンパク質*合成方法（mRNA 濃度、合成方法等）について検討し、初期の目標をスケジュール前倒しで達成した。

さらに、小麦胚芽抽出液製造のスケールアップと抗体の合成に適した無細胞タンパク質合成方法に関しては、慶應義塾大学と密に連携して研究を推進した。つまり、ゾイジーン社で開発した安価な小麦胚芽抽出液を慶応義塾大学に供与し､IVV 対応付け分子形成効率上昇について確認し、抗体選択自動化ロボットの実験に安定供給するとともにゾイジーン社で確立した一本鎖抗体合成技術を慶應義塾大学に技術トランスファーして本技術の有用性を評価した。

３）研究方法

３－１　小麦胚芽抽出液調製法の検討

a. 胚芽選別工程

ゾイジーン社ではすでに色彩選別機を用いた胚芽選別プロセスの機械化に成功しており、高純度の小麦胚芽を高収率で得ることが可能となっている。

b. 抽出工程

b-1 胚芽洗浄

単離した胚芽を流水洗浄し、胚芽に付着した胚乳を完全に洗い落とす工程であり、高活性小麦胚芽抽出液を調製する上で、胚芽の単離と合わせて愛媛大学遠藤教授の技術の最も重要なポイントである。

胚芽をガーゼに包み、ビーカーに入れた冷水（MilliQ 水）で水が白濁しなくなるまでもみ洗いする。次に、界面活性剤を入れた MilliQ 水で超音波洗浄し、最後に界面活性剤を洗い流して吸引ろ過で水を切る。本プロセスにおいては撹拌槽や洗米機（改造型）で胚芽を洗浄可能なことは確認済みであり、本研究では機械化への適応可能性についても検討した。

b-2 胚芽粉砕・抽出

従来は洗浄胚芽を乳鉢に入れ、液体窒素を加えて凍結粉砕を行った後、抽出バッファーを加えて乳棒で練りながら抽出を行っていた。この作業は低温室内で長時間を要するため、作業者の負担が大きかった。また、少量しか粉砕できないため作業効率も悪く、液体窒素による窒息の危険性もあった。本研究ではスケールアップ可能な胚芽粉砕・抽出方法の至適化について検討した。

b-3 遠心分離

通常は胚芽粉砕液を高速冷却遠心機により 30,000×g の重力加速度にて上清を回収する工程であるが、重力加速度と遠心時間及び遠心分離回数の至適化について検討した。本工程においてもスケールアップ可能なプロセスへの適用を考慮した。

b-4 精製

従来はファルマシア製 Sephadex G-25 マイクロスピンカラムを用いたバッファー交換と低分子物質の除去を目的としてゲルろ過を行っていた。しかし、スピンカラム方式では処理量が少なくコストも高いため、大量処理に適したカラムクロマト方式に変更するための条件検討を行った。

b-5 濃縮

ゲルろ過により希釈された小麦胚芽抽出液の保存安定性に問題が生じたため、限外ろ過装置を用いた抽出液の濃縮方法の最適化について検討した。

b-6 保管

濃縮された抽出液を無菌フィルターで濾過後、保管用のサンプルチューブに分注し、-80℃で冷凍保存する。

３－２　小麦胚芽抽出液を用いた無細胞タンパク質合成法の検討

a. mRNA の調製

a-1 小麦胚芽無細胞タンパク質合成用発現ベクターの構築

小麦胚芽無細胞系発現ベクターpEU3b［1］をもとに緑色蛍光タンパク質（GFP）及びジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）発現ベクターを構築し、小麦胚芽抽出液の*タンパク質*合成活性評価用ベクターとした。

a-2 転写

上記で調製した GFP 及び DHFR 発現ベクターを鋳型として、SP6 RNA ポリメラーゼ（Promega 製）を用いて転写を行った。得られた mRNA をエタノール沈殿により精製後、mRNA を RNase-free 水で溶解し、mRNA 溶液とした。

b. 小麦胚芽抽出液を用いた無細胞タンパク質合成法

b-1 タンパク質合成反応液の調製

参考文献 2 の方法に従い、小麦胚芽抽出液を 260 nm における吸光度が 40OD 量、0.4μg/μL mRNA を含む条件を基本とし、mRNA 濃度及び小麦胚芽抽出液濃度を変化させることによりタンパク質合成反応の至適条件について検討した。

b-2 無細胞タンパク質合成反応

上記無細胞タンパク質合成反応液 50μL を透析カップ（第一化学薬品製）中に入れ、図-1 に示す透析法により 26℃で 24～48 時間合成反応を行った。

３－３　小麦胚芽無細胞タンパク質合成系による活性型一本鎖抗体の効率的な合成法の検討

ゾイジーン無細胞タンパク質合成システムにおいて、分子内ジスルフィド結合を有し通常の合成条件では不溶化するタンパク質について、反応液中の酸化還元電位を制御することにより可溶性タンパク質として合成することが一部可能になっている。通常 DTT 濃度を低下させるとタンパク質の合成量は減少するが、本検討では、ある程度の合成量が確保されて、かつ可溶性タンパク質の発現量が増加することを指標として合成条件の最適化について検討した。

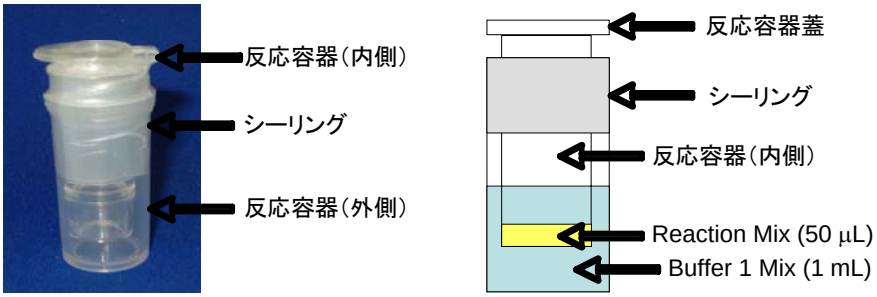


図-1、小麦胚芽無細胞蛋白質合成システムの概要

a. ゾイジーン無細胞タンパク質合成用資材以外に必要な試薬類

・バッファー1（DTT－）
・酸化型グルタチオン
・還元型グルタチオン

（いずれも RNase-free 実験専用にすることが望ましい）

b. 条件検討

ゾイジーン無細胞タンパク質合成用資材中の小麦胚芽抽出液には DTT が含まれているが、DTT－のバッファー1（DTT を含まないバッファー1）を用いて反応液（取扱説明書の Reacrion Mix）および外液（取扱説明書のバッファー1 Mix）を調製することにより、条件検討を行った。それぞれの溶液に酸化型グルタチオンを終濃度 0.5～1.0 mM、還元型グルタチオンを終濃度 2～10 mM 添加して合成反応を行った。

３－４　参考文献

1) Sawasaki, T., Ogasawara, T., Morishita, R. and Endo, Y. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99, 14652-14657.
2) Madin, K., Sawasaki, T., Ogasawara, T. and Endo, Y. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 559-564.

４）研究結果

４－１　小麦胚芽抽出液調製法の検討

a. 胚芽選別工程

小麦粉砕条件の至適化検討により無傷の胚芽を取り出すためには衝撃型粉砕機で適度な衝撃速度により粉砕することが望ましいことがわかった。実験室レベルの胚芽選別の場合は卓上の衝撃粉砕機を利用しているが、工業スケールでの胚芽選別工程に対応するために粉砕機メーカー数社でテストを実施し、機種選定、粉砕条件、能力の確認を行った。

小麦胚芽を用いた無細胞*タンパク質*合成の研究が始められた 1950 年代から胚芽の分離は四塩化炭素とシクロヘキサンの混合溶媒による浮沈分離が行われてきたが、本研究では環境問題や人体への悪影響を考慮し、塩素系溶媒を使わない粗胚芽分離プロセスとして振動選別法を開発し、従来に比べ胚芽あたりの溶媒使用量を３分の１まで削減することができた。

一方、従来は目視による手作業での胚芽選別を採用していたが、早い人でも胚芽を 1 g 取るのに１時間以上かかり、長時間作業が難しいという問題を抱えていた。今回、新たに色彩選別機を開発することにより、胚芽純度の向上ならびに胚芽選別能力の大幅な向上が実現できた。

b. 抽出工程

b-1 粉砕・抽出

胚芽と抽出バッファーを同時にワーリングブレンダーに入れ、適度な条件（仕込み量、回転数、粉砕時間）で胚芽を粉砕することにより、作業効率を飛躍的に向上させることができた。また、抽出液の品質（合成活性）も向上した。

b-2 遠心分離

遠心分離処理能力を向上させるため、遠沈管のサイズアップの検討を行った結果、重力加速度、遠心時間、遠心分離回転数に関して至適条件を見出すことができた。

b-3 精製

抽出液製造のスケールアップとコスト削減を図るために従来のスピンカラム方式からカラムクロマト方式に変更し、Sephadex G-25 ゲルろ過カラムクロマトグラフィーについて検討した結果、カラムサイズ、カラムへの負荷率等に関して至適条件を見出すことができた。また、工業スケールを想定したカラムサイズのスケールアップ検討も行い、良好な結果が得られた。

b-4 濃縮

保存安定性を向上させるために抽出液を濃縮する検討を行った結果、スケールアップに耐え得る濃縮工程として限外ろ過膜を用いたタンジェンシャルフローフィルトレーション（TFF）システムを採用した濃縮法を確立した。さらに、日本ポール社製 TFF 限外ろ過システムをベースとしたゾイジーン社独自の半自動化限外ろ過装置を開発し、濃縮方法の至適条件を見出すことができた。

以上の検討により最適化した小麦胚芽抽出液調製法の概略を図-2 に示す。

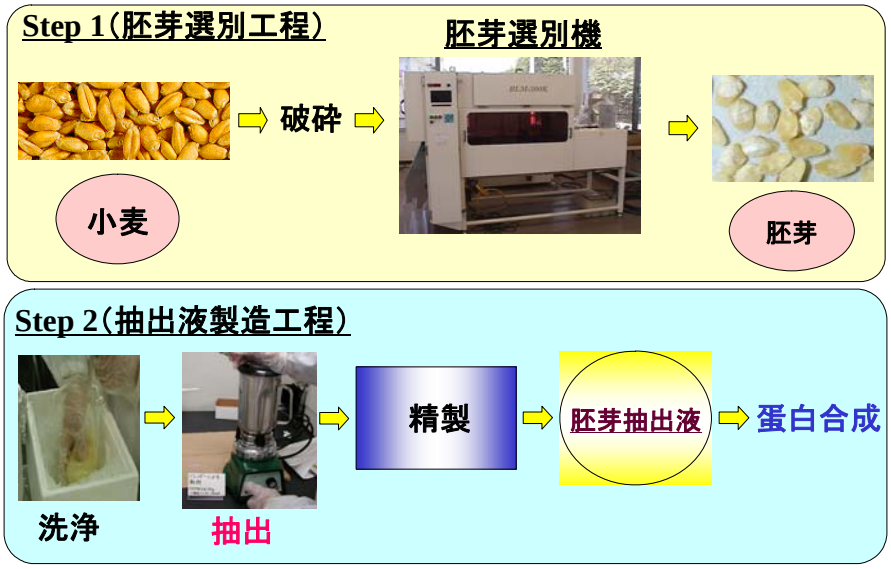


図-2、本研究で最適化した小麦胚芽抽出液調製法の概略

４－２　小麦胚芽抽出液を用いたタンパク質合成法の検討

a. mRNA の調製

SP6 RNA ポリメラーゼを用いた転写反応の至適条件を見出し、エタノール沈殿による簡便な mRNA 精製法を確立した。

b. 小麦胚芽抽出液を用いたタンパク質合成条件の至適化

本研究では小麦胚芽抽出液のタンパク質合成活性評価用の標準タンパク質として緑色蛍光タンパク質（GFP）とジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）を用いた。GFP 蛍光タンパク質の場合、反応液の蛍光強度を直接測定することにより簡便に GFP 合成量を算出することができる。

４ロットの抽出液を用いて同一条件で GFP 蛍光タンパク質及び DHFR を合成した結果、GFP 蛍光タンパク質の場合は 2 mg/mL、DHFR の場合は 1.5 mg/mL という高い合成活性を有することが確認された。また、GFP 蛍光タンパク質合成活性を指標に mRNA 添加濃度ならびに抽出液濃度の検討を行い、至適条件を見出した。

４－３　安価な小麦胚芽抽出液製造法の開発及び小麦胚芽抽出液の品質向上

上述の小麦胚芽抽出液製造工程においては小麦胚芽の選別が煩雑で長時間を要する工程であった。本研究では安価な小麦胚芽選別工程を確立することにより、従来の小麦胚芽抽出液に比べて製造コストを大幅に下げることが可能となった。また、短時間のタンパク質合成活性は従来品と同等であることから、今回開発に成功した小麦胚芽抽出液は IVV 法による多品種の抗体選択を行う上でコストパフォーマンスが高く、抗体の大量合成を行う上で有用であることが期待された。事実、本小麦胚芽抽出液は他社品に比べて、IVV 法による対応付け効率が高く、高分子量タンパク質の合成も可能であることが判明した。また、小麦胚芽抽出液の品質向上の実現にも成功し、平成 17 年 5 月からゾイジーン無細胞タンパク質合成キットとしての発売を開始した。本小麦胚芽無細胞タンパク質合成システムは特別な装置を用いなくても 6～8 時間で効率よく多品種のタンパク質の合成が可能である。本合成システムによるモデルタンパク質（GFP 蛍光タンパク質）合成の経時変化を図-3 に示す。GST や His タグを付加して合成した融合タンパク質はアフィニティカラムを用いてワンステップ精製が可能であり、ロボットを用いた多品種の一本鎖抗体の並列合

成にも適用可能である

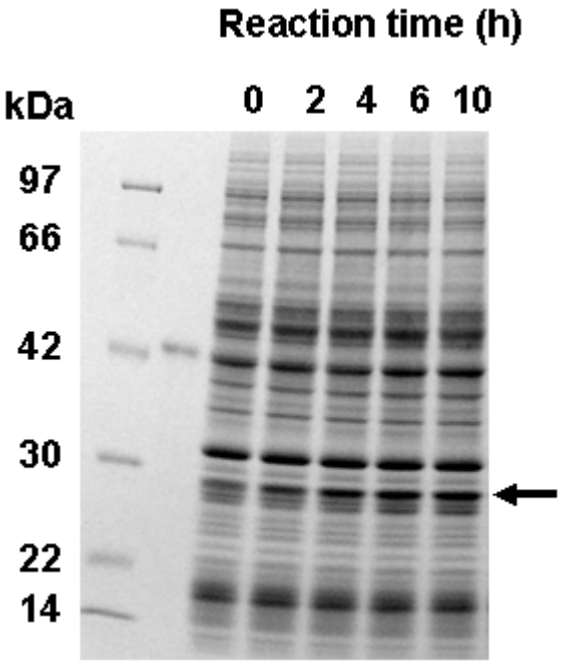


図-3、小麦胚芽無細胞*タンパク質*合成システムによる GFP 蛍光タンパク質合成の経時変化

４－４　抗体選択に適した小麦胚芽抽出液の調製方法の最適化

上記小麦胚芽抽出液を*慶應義塾大学*に供与して、その性能を調べたところ、抗体選択自動システムにおいても、IVV の対応付け効率が高いことが判明した。また、小麦胚芽無細胞タンパク質合成系による一本鎖抗体の合成検討を開始し、以下に示すように活性のある抗体が十分量合成可能であることを確認した。

４－５　小麦胚芽無細胞タンパク質合成系による一本鎖抗体の効率的な合成法の検討

一本鎖抗体のモデルタンパク質として抗リゾチーム抗体 HyHEL10 一本鎖抗体を選択し、東北大学大学院工学研究科の熊谷泉教授より供与された HyHEL10 一本鎖抗体遺伝子を用いて可溶性での合成検討を行った結果、酸化型及び還元型グルタチオン添加効果の再現性を確認し、HyHEL10 (V_L-V_H) が可溶性画分に再現性よく回収された。精製収量としては終濃度 0.5 mM 酸化型グルタチオン、4 mM 還元型グルタチオン初期添加の合成条件が最適であることが判明し、アフィニティ精製後 90μg/mL 反応液の収量であった。

さらに図-4に示すように、HyHEL10（V_L-V_H）を1 mL反応液でスケールアップ合成することにより可溶性への収量が増大した（150μg/mL反応液）。また、精製標品は大腸菌で発現した封入体からrefoldingにより調製した陽性対照と同等のリゾチーム阻害能を有することを確認した（図-5）。一方、HyHEL10（V_L-V_H）の最適な合成法は抗CD3一本鎖抗体の合成にも適用可能であることが判明し、合成された抗CD3一本鎖抗体はフローサイトメトリーによりT細胞表面への特異的な結合能を有することを確認した。

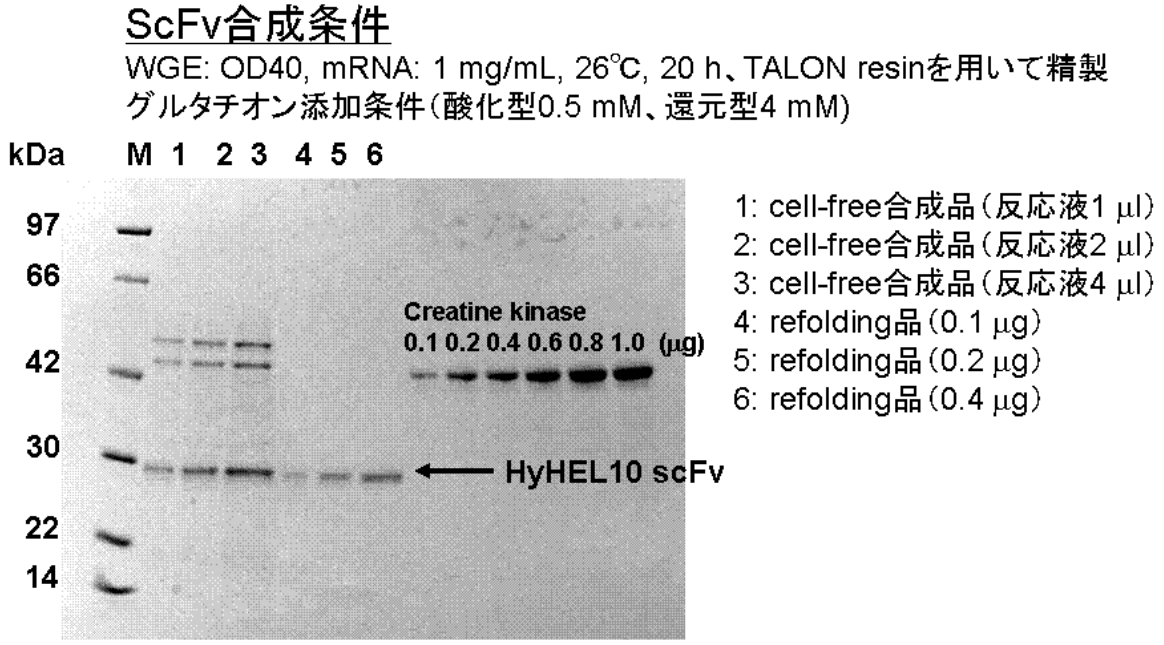


図-4、小麦胚芽無細胞合成系による HyHEL10（V_L-V_H）の効率的な合成及び精製

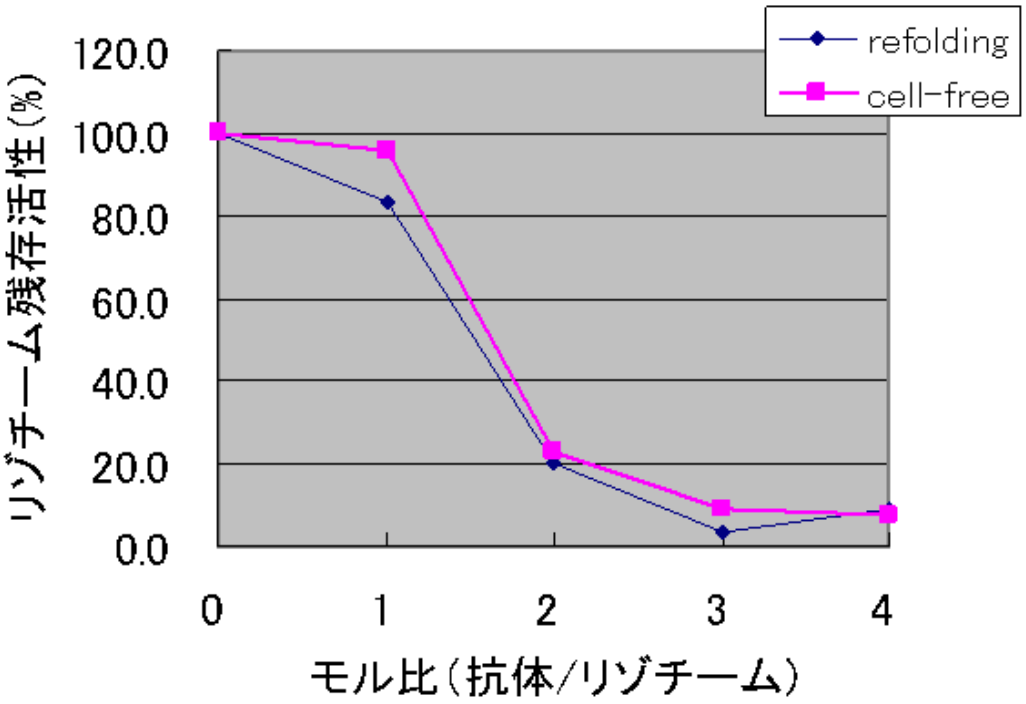


図-5、小麦胚芽無細胞合成系により調製した HyHEL10 （V_L-V_H） のニワトリ卵白リゾチーム阻害活性

５）考察・今後の発展等

無細胞タンパク質合成系は多品種のタンパク質を同時合成可能な技術であり、機能未知タンパク質の機能解析に適した発現系である。しかし、抗体工学の分野においては無細胞タンパク質合成系を利用した抗体の合成例は少ない。その理由としては通常の無細胞合成では抗体分子の分子内ジスルフィド形成が困難であり、タンパク質合成中に不溶化することが問題であった。また、それを克服するためにジスルフィド形成を優先させると抗体分子の合成量が低下することも理由の一つである。ゾイジーン社では抗ニワトリリゾチーム抗体 HyHEL10 一本鎖抗体をモデルタンパク質として選択し、小麦胚芽無細胞タンパク質合成系の反応組成について鋭意検討した結果、初期還元状態及び酸化速度等を制御することにより一本鎖抗体の分子内ジスルフィド結合の形成及び高いタンパク質合成量を維持した無細胞合成法を確立した。本合成法は抗ヒト CD3 抗体の効率的な合成にも応用可能であった。

一方、ゾイジーン社ではヒト末梢血由来 mRNA より IVV 法によりヒト一本鎖抗体遺伝子ライブラリーを作製し、慢性関節リウマチ等の炎症系疾患の発症に関係するヒトインターロイキン 6（IL-6）及びヒト腫瘍壊死因子α （TNFα）に対するヒト一本鎖抗体の取得を試みた。4 回の濃縮操作の後に各濃縮ライブラリーをクローニングし、塩基配列解析を行うとともに得られた各クローンを小麦胚芽無細胞タンパク質合成系にて合成し、各抗原に対する反応性を ELISA にて確認した。その結果、ヒト IL-6 については 2 種類の一本鎖抗体が抗原特異的に結合し、ヒト TNFα では 2 種類の一本鎖抗体と数種類の V_L 及び V_H が得られた。本研究で確立した小麦胚芽無細胞タンパク質合成系により合成した各種一本鎖抗体精製標品を用いた BIACORE による結合解析の結果、今回得られたクローンはナイーブなライブラリーから得られたものであるため、各抗原に対する結合活性は弱いことが確認された。今後は得られた一本鎖抗体遺伝子にランダム変異を導入して再度 IVV 法に

より高親和性抗体を選択したり、抗原との相互作用に重要な相補性決定領域（CDR）にフォーカスして変異を導入することにより抗体医薬として臨床応用可能なレベルの新規抗体の取得を目指している。
以上、本研究成果は今後の抗体工学分野において、IVV 技術と組み合わせた抗体選択及び抗体分子の高効率機能改変に大いに役立つ技術であると期待される。

６）関連特許
基本特許（当該課題の開始前に出願したもので、当該課題の基本となる技術を含む特許）について
1. 無細胞タンパク質合成用胚芽の選別方法及び無細胞タンパク質合成用胚芽抽出液の製造方法、特開 2005-198651(2005)、三菱化学株式会社、　土肥　直樹、岩橋　茂雄、森貞　重男
2. 無細胞タンパク質合成用細胞抽出液の製造法、WO 2005/083104 (A1)(2005)、三菱化学株式会社、 芳山　美子、古賀　裕久
3. ポリペプチド合成方法、WO 2005/123936 (A1)(2005)、三菱化学株式会社、 古賀　裕久

７）研究成果の発表
(成果発表の概要)

1. 原著論文（査読付き）	0 報　（筆頭著者：　報、共著者：　報）
2. 上記論文以外による発表	国内誌：　0 報、国外誌：0 報、書籍出版：0 冊
3. 口頭発表	招待講演：　１回、主催講演：　１回、応募講演：　４回
4. 特許出願	出願済み特許：　１件　（国内：　１件、国外：0 件）
5. 受賞件数	0 件

1. 原著論文（査読付き）
該当なし

2. 上記論文以外による発表
該当なし

3. 口頭発表
ポスター発表
1) Misawa S. et al. CHI PEGS “Difficult to Express Proteins” May 16-17, 2005, Boston, MA (http://www.zoegene.co.jp/en/Reference/PEGS_poster_ZOEGENE_Misawa.pdf)

2) Misawa S. et al. CHI PepTalk “Protein Expression” January 10-11, 2006, San Diego, CA (http://www.zoegene.co.jp/Reference/22_PepTalk_poster.pdf)

3) Koga H. et al. Antibody Engineering Conference June 16-17, 2006, Kagoshima, Japan (http://www.zoegene.co.jp/Reference/24_posters.pdf)

4) Eguchi C. et al. Antibody Engineering Conference June 16-17, 2006, Kagoshima, Japan (http://www.zoegene.co.jp/Reference/25_posters.pdf)

招待講演

1) Misawa S. CHI PepTalk “Protein Process Development” January 12-13, 2006, San Diego, CA (http://www.zoegene.co.jp/Reference/23_PepTalk_presentation.pdf)

主催・応募講演

1) 日本薬学会第126年会（仙台） 三沢 悟、ゾイジーン株式会社ランチョンセミナー “小麦胚芽無細胞*タンパク質*合成系と*タンパク質*構造解析の実例” 2007年3月29日、仙台国際センター
(http://nenkai.pharm.or.jp/126/program/pdf/07.pdf)

4. 特許出願

	出願・公告等の日付	「発明の名称」	発明者氏名	出願人名	特許等の種類・番号
1)	特願2006-288320	無細胞タンパク質合成用胚芽抽出物の製造方法	古賀 裕久 吉永 哲栄	ゾイジーン株式会社	特開2006-288320

*研究成果のどの部分の特許なのか、概要を記入してください。

1)概要：合成効率の高い無細胞タンパク質合成用胚芽抽出物を工業的に効率よく製造するための方法を提供する。

5. 受賞件数

該当なし

Ⅳ・実施期間終了後における取組みの継続性・発展性

本共同研究開発における基盤技術である IVV 法はほぼ完成の域にあり，特許戦略もアイデアの根幹となる基本特許および周辺特許を出願および取得済みで、ワールドワイドに展開されている。また、本共同研究に関係する IVV 法による抗体選択法に関しても、特許を出願している。本研究開発において制作された抗体選択ロボットが順調に作動し、高親和性、高選択性の一本鎖抗体の迅速なスクリーニングが可能になった。それ故、今後はゲノム創薬や診断試薬のためのより具体的な抗体を選定することが可能な技術状況にある。本共同研究開発に提示された抗体は医薬や診断ビジネスにおける要求度も極めて高く，また、バイオビジネス市場の動向と競争力から本自動化システムを用いた抗体作製の事業化は可能であると判断している。そのように判断した理由として、次のような抗体医薬をとりまく環境の変化がある。

通常の医薬品は低分子化合物を主成分としているが、生物材料を起源とする医薬品も存在し、生物製剤と呼ばれている。インターフェロン、インスリン、ペプチドホルモン、抗体などがそうである。米国では認可された新薬の 25%が既に生物製剤になり、その比率は現在臨床入りしている 400 品目以上のバイオ医薬と 4 倍以上低分子医薬と比べて生物製剤の上市成功率が高いことから、今後間違いなく増加すると思われている。更に、米 Athena 保険の調査では、05/06 年の米国での生物製剤の売り上げの伸びは 29%増、低分子はわずか 9%であった。ビッグファーマが生物製剤の「25%クラブ」入りに奔走するのは必然と言える。世界のビッグファームは抗体医薬を中心とした生物製剤のパイプラインを拡充､売り上げの 25%以上を生物製剤にする努力をしている。既に、スイス Hoffmann-La　Roche 社、米 Eli Lilly 社、米 Wyeth 社、独 MerckSerono 社、そして最近、米 MedImmune 社を買収した英 AstraZenecca 社がこのクラブ入りを果たした。低分子医薬の王者、米 Pfizer 社は現在猛烈な企業買収によって 10%まで生物製剤を増大している。力技でいずれ 25%クラブ入りすると思われる。翻って、我が国のトップ 4 社の生物製剤比率は、3%以下である。今我が国の製薬業界やバイオベンチャーに必要なのは、生物製剤、中でも抗体医薬である。

Ｖ．自己評価

１．　目標達成度

本共同研究開発では、慶應義塾大学が IVV 法を用いた抗体選択の基本操作の設定と完成したロボットでの選択実験および精度を上げるための微調整等を担当した。池田理化社は、抗体選択の自動化ロボット(１号機)と精製の自動化ロボット(２号機)の設計と組み立て、作動確認を担当した。ゾイジーン社は抗体選択に用いる小麦胚芽の無細胞抽出液の大量調製と選択された抗体の大量調製を担当した。

抗体選択の自動化システムの開発のような多様なノウハウを必要とする研究開発においては、異業種のモノづくりの知力を最大限に結集・発揮する必要がある。抗体選択の自動化システムの開発を目指して、抗体選択の基盤技術、ロボット設計・組み立て技術、小麦胚芽無細胞抽出液の調製・応用技術をもっている３者（慶大、池田理化社、ゾイジーン社）が共同で研究を行った。

本共同研究開発の目標は、*in vitro* virus 法（IVV 法）に基づき、多種の高親和性一本鎖抗体を迅速に調製する技術を開発することにある。IVV 法はタンパク質とそれをコードする核酸(mRNA)を連結した遺伝子型と表現型の対応付け分子のライブラリーを試験管内で構築する技術であり、この技術を用いると、抗原分子に特異的に結合する一本鎖抗体を、細胞を使わずに迅速かつ簡便に選択することができる。現在、この工程をマニュアルで行った場合の延べ日数は、４ない５つの抗原に対して４－６日を要する。本共同研究では、これらの工程を自動化し、一度に多数の抗原に対する抗体選択を短期間で完了することができるハイスループットなシステムの開発を目指した。研究の達成度の自己評価は、慶應義塾大学は、ほぼ１００％達成、池田理化社も、ほぼ１００％達成、ゾイジーン社も、ほぼ１００％達成したと考えている。その理由は以下のようである。本研究においてはそれぞれの研究機関が有機的に連携し調整しながら研究を推進した。すなわち IVV 法による抗体選択の基盤技術を元に、ロボット化に適した選択実験系の再構築を実施した。また、自動化ロボットは「洗浄工程、溶出工程」を行う抗体選択ロボットと、それ以外の「核酸（転写産物・PCR 産物など）精製」を行う精製ロボットの２機を開発した。ゾイジーン社が開発した小麦胚芽無細胞抽出液は IVV 法での高い対応付け効率を達成した。これらを組み合わせ実際に IVV 法による抗体選択を本自動化ロボットで実施した。その結果、高親和性、高選択性を示す一本鎖抗体を選択することができ、本研究の目標を達成した。

２．研究成果

慶應義塾大学

目標：IVV 法を用いた抗体選択技術を自動化し、一度に多数の抗原に対する一本鎖抗体の選択を短期間で完了可能にするハイスループットシステムの基本システムを確立する。構築した基本システムでの選択実験と得られた抗体の評価を行う。さらに、精度を上げるための基本システムの微調整と抗体の大量スクリーニングと大量調製を実現する。

結果：　IVV 法による抗体選択システムは、ライブラリーからの抗体選択工程、濃縮された遺伝子群のクローニングと塩基配列の解析工程、得られたサンプルの評価（親和性、発現量等）工程の３つからなる。今回我々が開発の対象とするのは、抗体選択工程と IVV 抗体ライブラリーの調製である。慶應義塾大学ではこれら抗体選択の６段階の作業工程の内、「洗浄工程、溶出工程」ロボット、「核酸（転写産物・PCR 産物など）精製」ロボット、の２機を設計開発にあたりロボット化に適した選択実験系の再構築を実施した。「洗浄工程、溶出工程」ロボットでは新たに開発された専用のカラムを使い実験プロトコルの見直しや改良が必要とされた。本ロボットについて、実際のマウスの抗体の cDNA ライブラリーを使いマニュアルによる実験との比較し調整を行った。その結果ロボットで選択の実験が稼動し DNA を回収できることが分かった。とくにロボットはマニュアルに比較し非常に効率的に洗浄が行われていることが分かった。溶出工程はソフトフェアーの開発によりマニュアルと同レベルの効率を達成した。また、制作された核酸精製ロボットに関しても微調整を行い、カラムを２４個装着時に吸引ポンプの圧力調整により、遠心力精製と同等の PCR 反応用の核酸の精製ができた。

小麦胚芽無細胞翻訳系の検討として共同研究機関のゾイージーン社が開発した翻訳系は IVV 対応付け分子形成効率が従来のものより向上し、再現性が良好であった。さらに同社と共同で、酸化型および還元型グルタチオン存在下における透析法での翻訳システムについて検討を行った。我々は従来高比活性な一本鎖抗体を得るために大腸菌を用いてペリプラズムに発現させてきたが、本システムはそれとほぼ同等の比活性を確認することができた。さらにペリプラズム発現に比べて容量あたり約 *1000* 倍の発現量を得ることができた。

以上の成果を組み合わせ、実際に IVV 法による抗体選択を本自動化ロボットで実施した。その結果、高親和性、高選択性を示す一本鎖抗体を選択、大量調製することができ、本研究の目標を達成した。

池田理化社

目標：慶應義塾大学で開発された IVV 法による高親和性一本鎖抗体の選択技術をもとに、その工程の自動化を図るための装置の開発、設計、制作、および制御ソフトウエアの開発、設計、制作を行う。

結果：池田理化社が設計開発を行う抗体選択と核酸精製の自動化ロボットは、モジュールごとに作業を分担させるシステムを採用した。抗体選択の６段階の作業工程の内、既存の技術では困難と思われる IVV 抗体ライブラリーから、レジンに固定化した抗原に高親和性をもつ抗体の選択を実施する「洗浄工程、溶出工程」ロボット、及び PEG スペーサーを連結させた mRNA（mRNA-PEG ライブラリー）の精製などを実施する「核酸（転写産物・PCR 産物など）精製」ロボット、の 2 機を開発した。

「洗浄工程、溶出工程」には、微量のアガロースビーズに結合したサンプルを大量のバッファーで洗浄する操作がある。本装置では、独自に開発した専用のカラム内でバッファーを吸排する

ことで、内部に入れたアガロースビーズを洗浄するようにした。分注および上述のカラムを装着するヘッドは、6 連を採用し、チップの自動装脱着を可能とした。カラムの輸送ユニットは独自のラックに計 24 本のカラムを立てた状態で装置内を移動できるようにした。また、バッファー類の分注は、前述の分注ヘッドとは別に本体横に設置したボトルより加圧圧送して 6 連ノズルからも供給することができるようにした。制御用のソフトウエアも自社で開発を行った。

ゾイジーン社

目標：IVV 法に基づき、多種の高親和性一本鎖抗体選択に適した小麦胚芽抽出液の製造技術の開発およびその抽出液を用いた一本鎖抗体の最適な合成法の開発を行う。

結果：　ゾイジーン社では無細胞*タンパク質*合成用小麦胚芽抽出液を大量に取得するために胚芽の選別工程の至適化ならびに抽出液調製条件の至適化を達成した。また小麦胚芽抽出液の品質向上の実現、抗体選択に適した小麦胚芽抽出液の調製方法の最適化について検討を行った。従来の小麦胚芽抽出液製造工程においては小麦胚芽の選別が煩雑で長時間を要する工程であったが、安価な小麦胚芽選別工程を確立することにより、従来の小麦胚芽抽出液に比べて製造コストを下げることが可能となった。また、従来品に比べて短時間の*タンパク質*合成活性は同等であることが確認されたことから IVV 法による抗体選択に適した安価な小麦胚芽抽出液としての応用が可能となった。事実、ゾイジーン社の独自技術により開発した小麦胚芽抽出液は他社品に比べて、IVV 法による対応付け効率が高く、高分子量*タンパク質*の合成も可能であることが判明した。本小麦胚芽抽出液を慶應義塾大学に供与して、その性能を調べたところ、抗体選択自動システムにおいても、IVV の対応付け効率が高いことが判明した。小麦胚芽無細胞*タンパク質*合成系による一本鎖抗体の合成検討を開始し、活性のある抗体が十分量合成可能であることを確認した。

３．研究計画・実施体制

本プロジェクトにおける慶應義塾大学の目標は、我々独自の技術である IVV 法を用いて、様々な抗原に対する高親和性一本鎖抗体をマウスの抗体 cDNA ライブラリーから非常に迅速に選択するハイスループットシステムの基本操作の設定である。上述したように、本共同研究の目標達成度についてはかなり達成されたと考えている。本プロジェクトでは、ツールの開発が主なので、基礎研究のレベルに留まらず、即、実用化可能なレベルまで技術レベルを引き上げるように努力した。本プロジェクト研究の成功には、様々な技術・方法論をもつ３つのグループ間の協力と密接な交流が不可欠であり、代表者の指導性の発揮がきわめて重要かつ効果的である。３年間、それぞれ独自の技術をもつ３つの研究グループが有機的に連携する実施体制によって、新しい技術的基盤を確立することができた。具体的には、慶應義塾大学が開発した IVV 法を用いた遺伝子型と表現型の対応付け技術により、ゾイジーン社の高効率な小麦胚芽の無細胞タンパク質合成系と池田理化社のロボット技術とを結びつけることにより、抗体選択の自動化システムの完成が可能になった。

生物工学系の研究者は自らの手で、その必要性に応じた先端的な装置を開発することは困難である。また試薬メーカーの提供する試薬を研究の必要性にあわせて改良してもらうことも簡単なことではない。一方開発メーカーも先端的な研究を詳細に理解し、個々の研究者の必要性に対応した装置開発に着手することは多くはなかった。しかしながら本共同研究では３者の立場と専門を異にする研究者と技術者が意見を出し合い、議論を重ねていった。そのような実施体制をとった結果、研究の必要性に合わせた装置の実現が可能となった。さらに、それぞれの専門の相互理解が促進されたものと考えられる。また今後の装置開発の方向性や次世代機開発目標のなどにも効果があった。これらの点から本共同研究により完成度の高い装置を実現することができたと考

えられる。